



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación de la eficiencia de biosorción de cadmio por
levaduras nativas para cultivos agrícolas usando
tomate *Solanum lycopersicum* L. como modelo
biológico en cultivos hidropónicos**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo, Microbiólogo
Parasitólogo**

AUTOR

Keny Pierson HUAYANAY OSTOS

ASESOR

Tito Libio SÁNCHEZ ROJAS

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

Quiero dedicar la presente a mis padres: Sr. Prof. Edwiges Huayanay Gambini, Sra. Prof. Nélida Ostos de la Cruz, por su gran labor docente, formarme, educarme y prepararme para conseguir mis sueños y metas. Por su amor, paciencia y apoyo incondicional en todo tiempo y circunstancia.

A mis hermanos Jhons Huayanay Ostos, Einstein Huayanay Ostos y Yessika Huayanay Ostos por su amor, paciencia y apoyo total.

A mi novia Rosa Ángela Mejía, por todo el amor y apoyo que me brindó, en tiempos buenos y malos. Todo te lo debo a ti, estoy seguro que sin ti a mi lado no hubiera sido posible llegar hasta este momento. Muchas gracias.

Al equipo científico del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología – Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Quienes me brindaron su apoyo incondicional durante el desarrollo de mi tesis. Gracias chicos: Tania Horna, Brenda Caso, Magerlyn Huamantalla, Wilma Quispe, Diana Alonso, Isabel Condori. Son parte de mi familia, no hubiera sido posible lograrlo sin su ayuda.

A los Bach. Diego Macedo y Bach. Lee Arrieta, por sus conocimientos, experiencia y asesoría en la parte microbiológica y en la identificación molecular de las cepas de levaduras y demás apoyo brindado en el desarrollo de la presente tesis.

A todos mis familiares y amigos que fui formando durante toda mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el financiamiento de la presente tesis (B17100604a).

Agradezco al Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT), por su contribución en la ejecución de mi tesis, que se realizó dentro del Proyecto: “Monitoreo y evaluación de la calidad del agua en cabecera de cuenca del Río Rímac, lagos y lagunas de la Región Central del Perú para determinar organismos indicadores y marcadores moleculares de contaminación por metales pesados”, Convenio N° 391-PNICEP-PIAP-2014.

Al Dr. Tito Libio Sánchez Rojas, por su gran y excelente asesoramiento durante todo el desarrollo de la presente investigación. Por la amistad, consejos que me brindo y la oportunidad de poder desarrollarme como profesional y científico.

Al Dr. Abad Flores Paucarima, jefe y responsable del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, por asesorarme y abrirme las puertas de su laboratorio y por la confianza que depositó en mí para el desarrollo de múltiples proyectos de investigación que aportaron en gran medida a mi desarrollo profesional.

A la empresa BIOXLAB S.A.C por su enorme apoyo en todo lo que necesité y brindarme las facilidades para poder desarrollar con éxito la presente tesis. Especialmente al Blgo. Yerson Duran; Blga. Jennifer Herencia. Gracias por toda la confianza depositada en mi persona para el desarrollo de proyectos de innovación y desarrollo.

Agradezco al Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UNMSM y a sus miembros por todo el apoyo brindado durante los ensayos finales de la presente tesis. Toda mi gratitud con ustedes.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Metales pesados en plantas agrícolas de interés comercial.....	6
1.2 Contaminación ambiental por metales pesados.....	8
1.3 Cadmio.....	9
1.4 Origen del cadmio en el ambiente.....	9
1.5 Bioacumulación.....	10
1.5.1 Bioacumulación de metales pesados en plantas.....	10
1.5.2 Plantas bioacumuladoras de cadmio	13
1.5.3 Tomate.....	14
1.5.3.1 Ciclo de vida (fenología).....	14
1.6 Cultivos hidropónicos.....	14
1.6.1 Hidroponía.....	14
1.7 Biorremediación.....	16
1.7.1 Procesos de biorremediación.....	16
1.7.1.1 Bioaugmentación.....	16
1.7.1.2 Bioestimulación.....	16
1.7.2 Interacción entre microorganismos y metales pesados.....	16
1.7.2.1 Biosorción.....	17
1.8 Levaduras y biorremediación.....	18
1.8.1 Antecedentes de uso de levaduras en biorremediación de metales pesados.....	19
1.9 Toxicología ambiental.....	20

1.9.1	Concentración letal media (CL ₅₀).....	21
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
2.1	Hipótesis.....	22
2.2	Objetivo general.....	22
2.3	Objetivos específicos.....	22
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
3.1	Material.....	23
3.1.1	Material biológico.....	23
3.2	Métodos.....	23
3.2.1	Reactivación y estudio cultural de las cepas de levaduras.....	23
3.2.2	Evaluación de la resistencia a metal cadmio.....	23
3.2.3	Ensayo de Concentración Letal Media (CL ₅₀).....	24
3.2.4	Cinética de biosorción de cadmio.....	24
3.2.5	Análisis y cálculo del porcentaje de cadmio en sobrenadante de cultivo de levaduras.....	25
3.2.6	Cinética de crecimiento.....	25
3.2.7	Sistema hidropónico.....	25
3.2.8	Germinación de tomate.....	26
3.2.9	Trasplante de plántulas de tomate.....	26
3.2.10	Acondicionamiento de cultivos hidropónicos.....	26
3.2.11	Preparación de inóculo de levaduras.....	26
3.3	Evaluación de la eficiencia de biosorción de cadmio en cultivo hidropónico de tomate	27
3.4	Análisis de Cd en tejidos de tomate y en solución hidropónica.....	28
4.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS.....	28

4.1 Extracción del ADN genómico.....	28
4.2 Amplificación por PCR de la región D1/D2 LSU.....	28
4.3 Secuenciamiento e identificación molecular.....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Reactivación y estudio cultural de las cepas de levaduras.....	29
5.2 Evaluación de la resistencia a diferentes concentraciones de Cd^{+2}	35
5.3 Concentración letal media (CL_{50}).....	36
5.4 Cinética de crecimiento.....	39
5.5 Calculo de la tasa de crecimiento (μ_x).....	42
5.6 Cinética de crecimiento con Cd^{+2} (40ppm).....	44
5.7 Calculo de la tasa de crecimiento frente a 40 ppm de cadmio.....	46
5.8 Cinética de biosorción.....	47
5.9 Porcentaje de remocion del metal.....	49
5.10 Biosorción de cadmio por levaduras en cultivo hidropónico.....	50
5.10.1 Determinación de la concentración de ion Cd^{+2} en tejidos de tomate.....	50
5.10.2 Determinación de la biosorción de Cd por levaduras.....	53
5.11 Efectos del ion Cd^{+2} y de las levaduras sobre el crecimiento de plantas de tomate.....	55
5.12 Identificación molecular de levaduras.....	59
6. DISCUSIÓN.....	60
7. CONCLUSIONES.....	67
8. RECOMENDACIONES.....	68
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
10. ANEXOS.....	70

ABREVIATURAS

MP: Metales pesados

MB: Medio Base

Cd: Cadmio

PR: Porcentaje de Remoción

CH: Cultivo Hidropónico

S.H: Solución Hidropónica

C.E: Comunidad Europea

LMP: Límite Máximo Permisible

ECA: Estándar de Calidad Ambiental

CL₅₀: Concentración Letal media 50

UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro

D.O: Densidad Óptica

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características culturales de las levaduras seleccionadas.....	29
Tabla 2. Evaluación de la resistencia a diferentes concentraciones de Cd.....	35
Tabla 3. Cálculo de la tasa de crecimiento (μ).....	42
Tabla 4. Porcentaje de biosorción de Cd^{+2} con 03 cepas de levaduras en medio base con 40 ppm de Cd^{+2}	49
Tabla 5. Concentración de Cd^{+2} en tomate.....	51
Tabla 6. Determinación de la eficiencia de biosorción de Cd por levaduras.....	53
Tabla 7. Porcentaje (%) de crecimiento de los tallos de las plantas de tomate.....	57
Tabla 8. Porcentaje (%) de crecimiento de las raíces de las plantas de tomate.....	57
Tabla 9. Comparación de medias de los tallos de las plantas del control_1 vs media de los tallos de las plantas tratadas con la levadura IM.....	83
Tabla 10. Comparación de medias de los tallos de las plantas del control_1 vs media de los tallos de las plantas tratadas con la levadura 25.1.....	84
Tabla 11. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs raíces de las plantas tratadas con la levadura IM.....	84
Tabla 12. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs raíces de las plantas tratadas con la levadura 25.1.....	85
Tabla 13. Comparación de medias de los tallos del control_1 vs tallos de las plantas del control_2.....	87
Tabla 14. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs raíces de las plantas del control_2.....	88
Tabla 15. Comparación de medias de los tallos del control_1 vs tallos de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd.....	90
Tabla 16. Comparación de medias de los tallos del control_1 vs tallos de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd.....	90
Tabla 17. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs media de las raíces de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd.....	92

Tabla 18. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs media de las raíces de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd.....	92
Tabla 19. Comparación de medias de los tallos del control_2 vs tallos de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd.....	94
Tabla 20. Comparación de medias de los tallos del control_2 vs tallos de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd.....	95
Tabla 21. Comparación de medias de las raíces del control_2 vs raíces de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd.....	96
Tabla 22. Comparación de medias de las raíces del control_2 vs raíces de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd.....	96
Tabla 23. Comparación de medias de los tallos de las plantas con levadura IM (lev1) vs tallos de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd.....	98
Tabla 24. Comparación de medias de los tallos de las plantas con levadura 25.1 (lev2) vs tallos de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd.....	98

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del cadmio en la naturaleza.....	10
Figura 2. Diferentes mecanismos de captación de Cd en plantas.....	11
Figura 3. Plantas acumuladoras de Cd.....	12
Figura 4. Etapas del ciclo de vida del tomate.....	14
Figura 5. Sistema hidropónico básico.....	15
Figura 6. Micrografía de las colonias de la cepa 25.1.....	30
Figura 7. Micrografía de colonias de la cepa 11.10.A.....	31
Figura 8. Micrografía de colonias de la cepa IM.....	32
Figura 9. Micrografía de colonias de la cepa 11.10.X.....	33
Figura 10. Micrografía de colonias de la cepa 17.1.2.....	34
Figura 11. Concentración letal media CL_{50} de la cepa IM.....	36
Figura 12. Concentración letal media CL_{50} de la cepa 11.10.A.....	37
Figura 13. Concentración letal media CL_{50} de la cepa 25.1.....	37
Figura 14. Concentración letal media CL_{50} de la cepa 11.10.X.....	38
Figura 15. Concentración letal media CL_{50} de la cepa 17.1.2.....	38
Figura 16. Cinética de crecimiento de la cepa IM.....	39
Figura 17. Cinética de crecimiento de la cepa 25.1.....	40
Figura 18. Cinética de crecimiento de la cepa 11.10.A.....	40
Figura 19. Cinética de crecimiento de la cepa 11.10.X.....	41
Figura 20. Cinética de crecimiento de la cepa 17.1.2.....	41
Figura 21. Tasa de crecimiento de la cepa IM. Igual a 0.67 h^{-1}	43
Figura 22. Tasa de crecimiento de la cepa 25.1. Igual a 0.14 h^{-1}	43
Figura 23. Tasa de crecimiento de la cepa 11.10.A. Igual a 0.016 h^{-1}	43
Figura 24. Tasa de crecimiento de la cepa 11.10.X. Igual a 0.002 h^{-1}	43
Figura 25. Tasa de crecimiento de la cepa 17.1.2. Igual a 0.01 h^{-1}	43

Figura 26. Cinética de crecimiento de la cepa 25.1 a 40 ppm de Cd.....	44
Figura 27. Cinética de crecimiento de la cepa 11.10.A a 40 ppm de Cd.....	45
Figura 28. Cinética de crecimiento de la cepa IM a 40 ppm de Cd.....	45
Figura 29. Tasa de crecimiento a 40 ppm de Cd de la cepa IM. Igual a 0.097 h^{-1}	46
Figura 30. Tasa de crecimiento a 40 ppm de Cd de la cepa 25.1. Igual a 0.019 h^{-1}	46
Figura 31. Tasa de crecimiento a 40 ppm de Cd de la cepa 11.10.A. Igual a 0.01 h^{-1}	46
Figura 32. Cinética de biosorción de la cepa 11.10.A.....	47
Figura 33. Cinética de biosorción de la cepa 25.1.....	48
Figura 34. Cinética de biosorción de la cepa IM.....	48
Figura 35. Acumulación de Cd^{+2} en tallos.....	52
Figura 36. Acumulación de Cd^{+2} en raíces.....	52
Figura 37. Biosorción de Cd por levaduras (ppm).....	54
Figura 38. Porcentaje de biosorción (%) de Cd por levaduras.....	54
Figura 39. Medias del crecimiento de los tallos (cm).....	58
Figura 40. Medias del crecimiento de las raíces (cm).....	58
Figura 41. Amplicones en gel de agarosa al 2% de la región D1/D2 LSU de las 5 levaduras altoandinas.	59

RESUMEN

El cadmio es un metal pesado que se encuentra en los suelos y aguas formando diferentes compuestos que son asimilados y acumulados por las plantas significando la primera entrada de este en la cadena trófica y en consecuencia su acumulación en los seres vivos por el consumo de estas en su dieta diaria. Con el objetivo de seleccionar las cepas que puedan ser usadas en la remoción de cadmio (Cd^{+2}) en hidroponía, se trabajaron con cinco cepas de levaduras proporcionadas por el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, las cuales fueron sometidas a ensayos de resistencia, concentración letal media (CL_{50}), cinética de crecimiento, cinética de biosorción. En base a los parámetros mencionados se seleccionaron a las cepas IM y 25.1. Debido a que se determinó que la CL_{50} para el Cd^{+2} fue de 70 ppm para ambas cepas, la biosorción en medio base (MB) con 40 ppm de Cd^{+2} fue de 64,2 y 52,0% respectivamente. Para los ensayos de biosorción en hidroponía, un grupo de plantas de tomate fueron inoculadas con levaduras a una concentración aproximada de 10^7 UFC/ml, además de ello se tuvieron dos grupos control correspondiente a plantas expuestas a 10 ppm de Cd^{+2} y plantas cultivadas en solución hidropónica ambos sin inóculo de levaduras. Luego de 20 días, se retiraron y se midieron el tamaño de las plantas de ambos grupos y se determinaron las concentraciones de Cd^{+2} acumulado en raíces, tallos y hojas mediante espectrofotometría de absorción atómica. Las levaduras IM y 25.1 disminuyeron la acumulación de Cd^{+2} en las plantas de tomate en 36,45% (1,49 ppm) y 29,39% (1,20 ppm) respectivamente. Además se logró evidenciar que dichas cepas estimularon el crecimiento de las plantas de tomate con respecto a los controles. Las cepas IM y 25.1 fueron identificadas molecularmente como *Yarrowia lipolytica*. Por tanto las levaduras presentan potencial para ser usados en procesos de biorremediación de Cd^{+2} y también como bioestimulantes en el crecimiento de plantas.

Palabras clave: Biosorción microbiana, levaduras nativas, cadmio, *Yarrowia lipolytica*, biorremediación.

ABSTRACT

Cadmium is a heavy metal found in soils and waters forming different compounds that are assimilated and accumulated by the plants that mean the first entry of this in the trophic chain and consequently their accumulation in living beings by the consumption of these in your daily diet. In order to select the strains that can be used in the removal of cadmium (Cd^{+2}) in hydroponics, we worked with five yeast strains provided by the Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology, which were subjected to resistance tests, mean lethal concentration (LC_{50}), growth kinetics, biosorption kinetics. Based on the parameters that are selected in the IM and 25.1 strains. Because it was determined that the LC_{50} for Cd^{+2} was 70 ppm for both strains, the biosorption in base medium (MB) with 40 ppm of Cd^{+2} was 64.2 and 52.0% respectively. For biosorption trials in hydroponics, a group of tomato plants were inoculated with yeasts at a concentration of approximately 10^7 CFU / ml, in addition to controlling the groups to plants exposed to 10 ppm of Cd^{+2} and plants grown in hydroponic solution both without yeast inoculum. After 20 days, the size of the plants of both groups was removed and the concentrations of Cd^{+2} accumulated in roots, stems and leaves were determined by atomic absorption spectrophotometry. IM and 25.1 yeasts decreased the accumulation of Cd^{+2} in tomato plants by 36.45% (1.49 ppm) and 29.39% (1.20 ppm) respectively. It was also possible to demonstrate that the strains are produced in the growth of the tomato plants with respect to the controls. Strains IM and 25.1 were identified molecularly as *Yarrowia lipolytica*. Therefore yeasts are potentially potential to be used in Cd^{+2} bioremediation processes and also as biostimulants in the growth of plants.

Key words: Microbial biosorption, native yeasts, cadmium, *Yarrowia lipolytica*, bioremediation

INTRODUCCION

La contaminación de los suelos proviene de diferentes fuentes, generando impactos negativos en los ecosistemas terrestres, superando la capacidad de amortiguación o asimilación del suelo dependiente de las condiciones fisicoquímicas existentes. Los contaminantes van a superar los estándares de calidad ambiental volviéndose una fuente de contaminantes (Cheng *et al.*, 2001).

Una de las principales causas de contaminación del ambiente es por metales pesados derivados de actividades antropogénicas (minería, industria alimentaria, industria farmacéutica, industria electrónica, residuos sólidos urbanos, industria agrícola), también la presencia de metales pesados en el ambiente (suelo, agua, aire) se da por procesos naturales geogénicos como la erosión de los suelos, lixiviación de minerales, actividad volcánica, etc. (Galán 2004; Casamorin 2014). Estos al acumularse a lo largo del tiempo producen la biomagnificación; es decir, la acumulación de sustancias tóxicas a lo largo de la cadena trófica, sobrepasan los límites normales generando diferentes problemas en el ambiente y en consecuencia también a los organismos que están en contacto con los metales. (Galán, 2004; Guerra, 2014; Gutiérrez, 2015; Wang, 2006).

La Environmental Protection Agency (EPA, por sus siglas en inglés) incluye en la lista de contaminantes prioritarios a trece elementos: antimonio, arsénico, berilio, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y zinc, siendo el berilio uno de los más tóxicos y disponibles (Galán, 2014).

En suelos destinados para actividades agrícolas la concentración y cantidad de metales pesados se incrementan de manera significativa con el pasar de los años debido a actividades realizadas por el ser humano como las malas prácticas agrícolas, minería, refinería, agroquímicos, pesticidas, desechos sólidos, etc. Estos en consecuencia generan contaminación a las plantas y cultivos de interés comercial (Kabata-Pendias, 1995). Los metales que son asimilados por las plantas inhiben o activan ciertos procesos enzimáticos afectando la productividad cualitativa o cuantitativamente (Miteva *et al.*, 2001).

El plomo (Pb), el arsénico (As), el cadmio (Cd), el zinc (Zn), y otros metales pesados pueden ser absorbidos por las plantas (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2006) hasta concentrarse en sus tejidos a niveles tóxicos. Tal situación puede ser una posible vía de entrada de estos metales en la cadena alimentaria humana a través del consumo de plantas, directa o indirectamente por los seres humanos. Hay evidencias de que el Pb y Cd han sido la causa de efectos negativos sobre la salud humana, de la mortandad en animales, y la perturbación de los ecosistemas naturales y los agro-ecosistemas (Guerra, 2014).

El cadmio es un elemento que las plantas absorben por difusión como catión divalente Cd^{+2} , es el ion más predominante y la forma móvil de Cd en el suelo y en el medio ambiente. Es muy móvil dentro de la planta y su absorción puede ocurrir pasiva o metabólicamente. El porcentaje de Cd^{+2} en las diversas partes de la planta, se incrementa en respuesta a las altas concentraciones externas. Las raíces retienen la mayor parte del metal absorbido (Hardiman *et al.*, 1984). El cadmio no tiene función metabólica en plantas, pero pueden acumularse en la raíz y en las partes comestibles (Kabata-Pendias, 2011).

Existen en la actualidad tecnologías para recuperar los metales del medio, sin embargo, dichas tecnologías tienen elevados costos, generan contaminación adicional y no logran recuperar la totalidad de los metales. Dichas tecnologías aplican tratamientos fisicoquímicos para la recuperación de metales, como la electrólisis, tratamientos eléctricos, evaporación, precipitación química, adsorción, reacciones químicas para formar compuestos y cambiar la valencia de un elemento químico por tanto hacerlo menos tóxico. En consecuencia, ningún tratamiento fisicoquímico asegura una buena recuperación de metales pesados (Gutiérrez, 2015).

Frente a este problema, surgió la necesidad de investigar nuevas tecnologías que nos permitan recuperar y disponer los metales pesados del ambiente, por tanto desde hace muchos años, se viene investigando a los microorganismos (bacterias, algas, mohos, levaduras, plantas, etc.) que tengan la capacidad de tolerar y/o remover a los distintos metales pesados (Casamolin, 2014).

La biosorción, es una técnica reportada desde hace décadas, y se presenta como una alternativa viable frente a los tratamientos tradicionales, puesto que en este proceso se emplea biomasa (conjunto de células vivas o muertas) para aprovechar las cualidades que tienen los microorganismos como parte de su morfología; los cuales tienen cargas negativas (-) en la superficie, capturando por un proceso físico químico a los metales que presentan cargas positivas (+) o incluyen a dichos metales como parte de su proceso metabólico (Wang, 2010).

El presente trabajo plantea el aprovechamiento de la capacidad que poseen las levaduras para ser aplicados en procesos de biosorción de metales pesados en cultivos contaminados con cadmio.

1. MARCO TEÒRICO

1.1 METALES PESADOS EN PLANTAS AGRICOLAS

La presencia de niveles altos de metales pesados en suelos y aguas usados para fines agrícolas pueden resultar sumamente tóxicos para los diferentes cultivos de interés comercial en nuestro país (Cacao, café, trigo, arroz, cebada, tomate, hortalizas, etc.). La absorción de metales pesados por plantas significa el primer paso para la entrada de éstos en la cadena alimentaria (Prieto *et al.*, 2014).

En los últimos años se está reportando el aumento en la presencia de metales pesados en hortalizas, frutos y partes comestibles de distintas plantas agrícolas de interés comercial; por tanto, el interés de conocer los efectos adversos de la absorción y acumulación de metales pesados se ha incrementado (Valdiviezo, 2002). Se tiene referencias que el cadmio (Cd) tiene una acumulación notoria en plantas como el tomate, pero se desconoce la concentración que se acumula en el fruto. La planta de tomate tiende a acumular metales pesados, en especial el metal Cd que lo acumula en las raíces en gran medida, esto debido a que dicha estructura de la planta está en contacto directo con el suelo y con el agua (Hardiman *et al.*, 1984; Albert, 1985).

El cadmio (Cd^{2+}) es un elemento no esencial para las plantas, absorben el metal por difusión, es muy móvil dentro de la planta, su absorción puede ser pasiva o por metabolismo activo (Leita *et al.*, 1996).

El Codex Alimentarius, organismo creado por la FAO y la OMS en 1963, es el encargado dar las normas internacionales para garantizar la inocuidad alimentaria y seguridad del consumidor. El Codex específicamente para los metales pesados; hace hincapié en los niveles máximos permitidos para el plomo, el cadmio, el arsénico, el mercurio, el metilmercurio y el estaño.

Para el cadmio, el Codex establece límites para varios alimentos entre los cuales se mencionan hortalizas, legumbres, cereales (Códex Alimentarius, 1997). Una de las plantas cuyo fruto, es actualmente uno de los productos con mayor demanda en el

mercado internacional, es el Cacao (*Theobroma cacao* L.). La planta de cacao absorbe ligeramente los metales pesados que existen naturalmente en los suelos y los concentra en las semillas grasosas. Según las regiones, el tipo de suelo, el grado de concentración de metales pesados es diferente (CITE CACAO 2011). Sin embargo, se reporta que las almendras de cacao presentan contaminación por metales pesados, entre los cuales se destaca el cadmio (Cd^{+2}), causante de una serie de enfermedades entre los que cabe mencionar: daño renal, problemas pulmonares; además una exposición a corto plazo produce alteraciones sensoriales, vómitos, náuseas, calambres musculares etc., (Casamorin, 2014). En consecuencia los productos derivados del cacao, presentan diferentes concentraciones de Cd, esto según el tipo de cacao que se use y el proceso que se emplee (Jiménez, 2015).

Las Normativas de Alimentación de la Comunidad Europea para el año 2019 plantean reducir los niveles máximos permisibles para el cadmio en el cacao y sus principales derivados a 0,3 mg/kg, actualmente los reportes han determinado la presencia de Cd^{+2} en 0,6 mg/kg de pulpa de cacao. Sin embargo, solo en algunos países existen límites máximos permisibles para Cadmio, en otros países solo se tienen normativas para sus derivados. No existe una norma global que regule los niveles de Cadmio. De la misma manera para el tomate y otras hortalizas se plantea reducir los niveles a 0.050 mg/kg (Jiménez, 2015).

De acuerdo a la Agencia de Salud de Alemania Federal, el límite permisible de Cd en vegetales verdes, frutas vegetales, arroz, papas, coles, coliflor, tomate, calabaza, cebolla y raíces comestibles es de 0,1 mg kg⁻¹ de peso fresco (Meriam, 1991).

Perú cuenta con la Norma Técnica Peruana (NTP) que da los lineamientos para los requisitos fisicoquímicos, microbiológicos y técnicos que deben cumplir las hortalizas, frutos y demás vegetales comestibles. Sin embargo, no menciona ni precisa requisitos concretos para metales pesados entre ellos el cadmio, quedando un vacío legal que no solo afectará las exportaciones según los nuevos límites permisibles de la Comunidad Europea, si no también se afectara la salud del país entero ya que la

población desconoce cuanta cantidad de metal pesado ingiere en su diete diaria (Comisión de los Reglamentos Técnicos y Comerciales - INDECOPI, 2008).

1.2 Contaminación ambiental por metales pesados

Los metales pesados son elementos químicos que se encuentran de manera natural formando compuestos y su distribución depende de una serie de factores. Sin embargo, durante los últimos años se viene reportando cantidades que sobrepasan los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) y los Límites Máximos Permisibles (LPM) tanto en agua, suelo y aire. Este incremento en la concentración de metales pesados en el ambiente es principalmente de origen humano (Gutiérrez, 2015)

La peligrosidad de los metales pesados reside en que no pueden ser degradados (ni química, ni biológicamente) y, además, tienden a bioacumularse y a biomagnificarse (que significa que se acumulan en los organismos vivos alcanzando concentraciones mayores que la que alcanzan en los alimentos o medioambiente, y que estas concentraciones aumentan a medida que ascendemos en la cadena trófica), provocando efectos tóxicos de muy diverso carácter (MINAM, 2017).

Los metales pesados de mayor preocupación social por el impacto que generan son principalmente cadmio (Cd), mercurio (Hg), cobre (Cu), plomo (Pb), entre otros (Malik, 2013).

La mayoría de estos metales alteran las actividades biológicas mediante la formación de enlaces entre el metal y el grupo sulfhidrilo de las proteínas y enzimas, ocasionando disfunción en las moléculas bioactivas (Beltrán, 2016) provocando ulceraciones en la piel, irritaciones gastrointestinales, aparición de cáncer y otras enfermedades degenerativas e inducción de mutaciones genéticas (Ballardo, 2015), daños en la función nerviosa central, menores niveles de energía y daño a la composición sanguínea, pulmones, riñones, hígado y otros órganos vitales (Malik 2013).

1.3 Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal pesado, perteneciente al grupo 12 de la tabla periódica. En su forma de metal puro es blando, dúctil y maleable con un color plateado claro (Greenwood, 2012). Es sumamente tóxico al igual que el mercurio y el plomo. Dicha toxicidad radica en su largo tiempo de vida y en su capacidad de acumularse en diferentes partes de los seres vivos (bioacumulación), su distribución en la naturaleza es amplia y se encuentra relacionado a diferentes tipos de minerales (Capó, 2007). El cadmio se encuentra en la naturaleza con valencia 2+, por lo que en solución forma especies químicas tales como cloruro de cadmio (CdCl^+), hidróxido de cadmio (CdOH^+), octavita (CdHCO^{3+}), cloruros de cadmio (CdCl^{3-} , CdCl_4^{2-}), hidróxidos de cadmio ($\text{Cd}(\text{OH})^3$ y $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$) y quelatos orgánicos (Kabata, 2000). La distribución depende de varios factores entre ellos el pH del medio, potencial redox, abundancia de materia orgánica en el medio, factores hidráulicos, químicos y microbiológicos (Gutiérrez, 2015).

1.4 Origen del cadmio en el ambiente

Son diversas las fuentes de origen del cadmio, gran parte de la distribución de cadmio en el ambiente es por consecuencias geológicas como la erosión de las rocas, las actividades volcánicas liberan grandes cantidades de cadmio a la atmosfera. Sin embargo, se reporta que la mayor presencia de cadmio en los diferentes ambientes y el incremento del mismo es causado por la actividad humana como consecuencia del desarrollo de sus diferentes actividades económicas entre los cuales se encuentra la minería (genera relaves con grandes concentraciones de metales pesados), la industria (fabricación de baterías, cables, colorantes de cadmio, soldaduras, PVC, etc.), la producción y uso de fertilizantes fosfatados, entre otros como la incineración de maderas, plásticos, etc. (Figura 1)

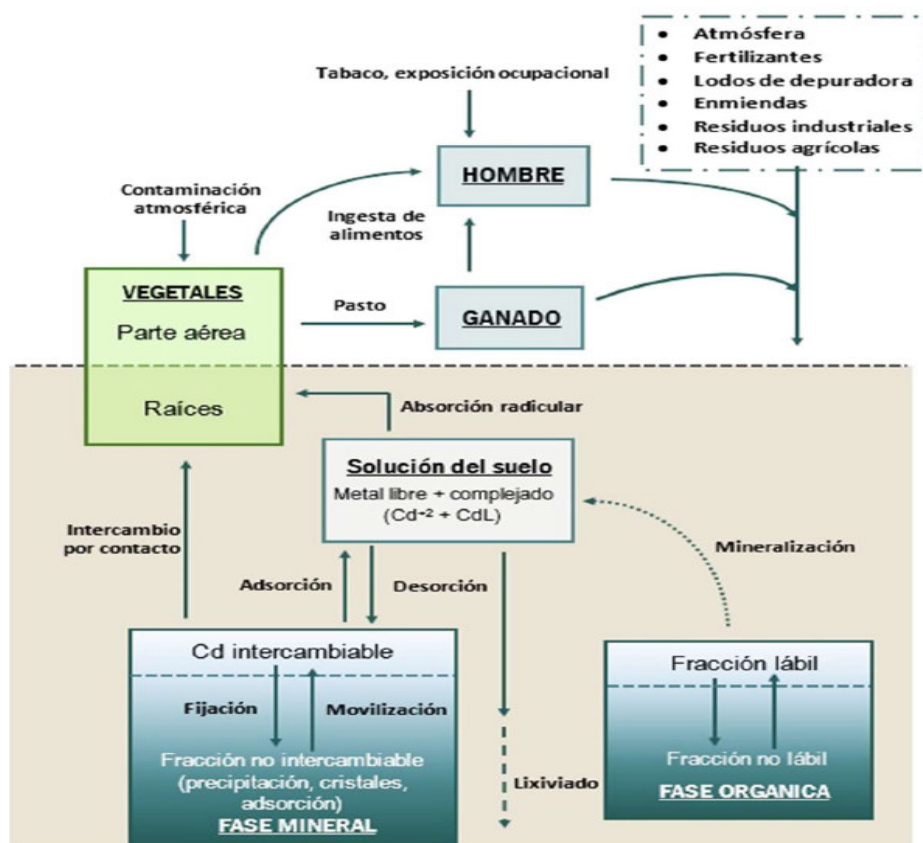


Figura 1: Distribución del cadmio en la naturaleza.
Fuente: Modificado de McLaughlin & Singh, 1999.

1.5 BIOACUMULACIÓN

La bioacumulación es el aumento de la concentración de un compuesto químico en un organismo vivo en un periodo de tiempo determinado en comparación con el compuesto químico presente en el ambiente (Méndez *et al.*, 2009).

1.5.1 Bioacumulación de metales en plantas

Las plantas han desarrollado mecanismos altamente específicos para absorber, translocar y acumular sus nutrientes; sin embargo, la presencia de metales pesados (MP) en ambientes en donde se cultivan plantas hace que estos sean asimilados por las plantas debido a que dichos metales presentan comportamientos electroquímicos similares a los que se encuentran en los nutrientes que son asimilados (Lasta 2000).

La bioacumulación de metales pesados en plantas significa la primera vía de entrada de dichos compuestos nocivos a la cadena alimentaria y su posterior distribución por consumo humano y/o animal (John y Leventhal, 1995).

La absorción y la bioacumulación de MP está en relación directa con varios factores, entre los cuales cabe destacar: el movimiento de los metales a la raíz de la planta, el paso de los metales por las células corticales de la raíz, el transporte de los metales desde las células corticales al xilema para su transporte a la raíz y los tallos, hojas y demás tejidos de almacenamiento (semillas, tubérculos, frutos) (John y Leventhal, 1995).

Se ha reportado otro mecanismo de ingreso de los MP por vía absorción foliar (ver Figura 2), lo cual es mediado por una fase de penetración cuticular y un mecanismo de carácter metabólico que considera la acumulación de los elementos contra un gradiente de concentración. La contaminación de fuentes aéreas podría influir de manera significativa en la acumulación de los MP en tejidos de plantas (Kabata & Pendias, 2000)

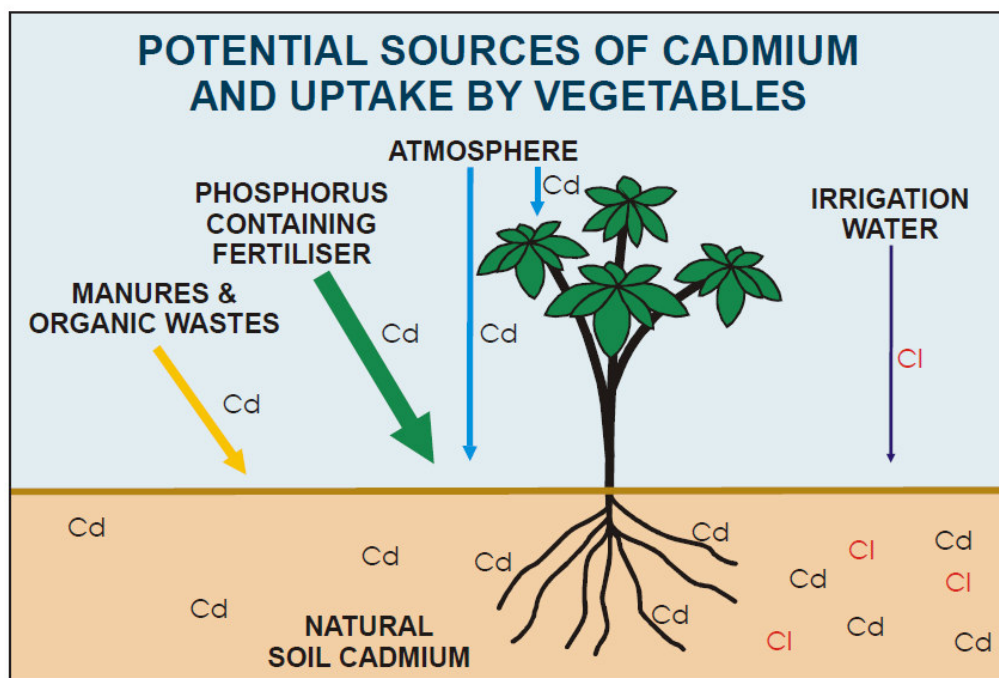


Figura 2: Diferentes mecanismos de captación de Cd en plantas.

Fuente: National Cadmium Minimisation Committee

www.cadmium-management.org.au

1.5.2 Plantas bioacumuladoras de cadmio

Las plantas que son capaces de absorber y acumular metales pesados por sobre los límites establecidos se denominan plantas hiperacumuladoras, y estos se encuentran en suelos cuya presencia de metales puede deberse a condiciones geoquímicas y antrópicas (Kabata, 2000).

La acumulación obedece a múltiples factores, de los cuales los más importantes son el pH del suelo, el potencial rédox, materia orgánica y agua (Martínez *et al.*, 2008), finalmente es importante conocer que no todas las plantas acumulan Cd en la misma cantidad y es variable según la especie (Prince *et al.*, 2002).

En la Figura 3 se puede notar los principales vegetales y la susceptibilidad que poseen en absorber y acumular cadmio desde niveles bajos, medios hasta niveles altos. El pepino acumula Cd en bajos niveles mientras que el tomate y demás hortalizas tienen una acumulación media, y finalmente se observa que la espinaca y el ajo son unas plantas que acumulan en gran medida el Cd, y muchas de estas hortalizas son de consumo diario en la dieta de todas las personas en nuestro país y el mundo.

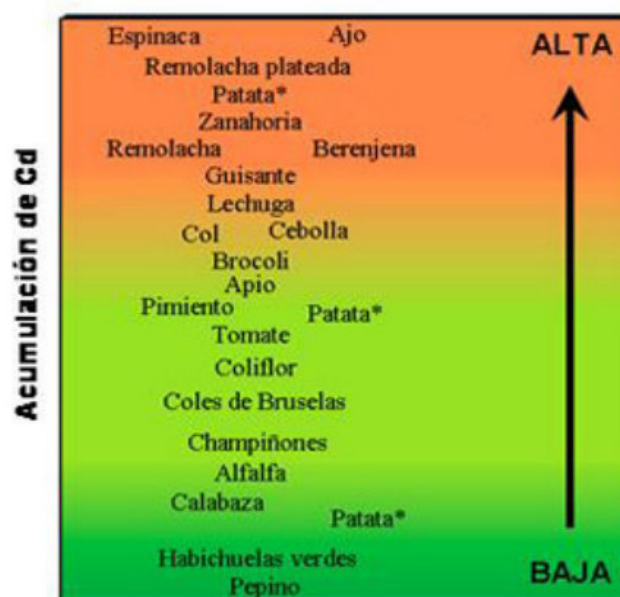


Figura 3. Plantas acumuladoras de Cd.

Fuente: National Cadmium Minimisation Committee
www.cadmium-management.org.au

1.5.3 Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es originario de América de Sur, fue introducido a Europa en el siglo XVI y a mediados del siglo IX se inició su cultivo masivo con fines industriales. Es uno de los cultivos de mayor consumo a nivel mundial con 130 millones de toneladas por año. Esta demanda está en incremento debido a que posee propiedades nutricionales (licopeno, minerales, vitaminas, etc.). Según Agrodatab Peru, las exportaciones aumentaron en 456% desde el año 2012. Su importancia también radica en que forma parte de múltiples dietas alimentarias. Sin embargo poco se conoce sobre la presencia de metales pesados en cultivos de este vegetal se debe a que en nuestro país no existen normativas específicas que regulen los niveles de metales pesados, solo se hace un control microbiológico.

1.5.3.1 Ciclo de vida (fenología)

1. **Inicial:** Inicia con la germinación de la semilla la planta invierte su energía en la síntesis de nuevos tejidos de absorción y fotosíntesis.
2. **Vegetativa:** Inicia a los 21 días después de la germinación y dura entre 25 a 30 días antes de la floración. Esta fase requiere de mayores cantidades de nutrientes para satisfacer las necesidades de las hojas y ramas en crecimiento y expansión.
3. **Reproductiva:** Inicia a partir de la fructificación, dura entre 30 a 40 días, el crecimiento de la planta se detiene, los frutos extraen los nutrientes necesarios para su crecimiento y maduración.

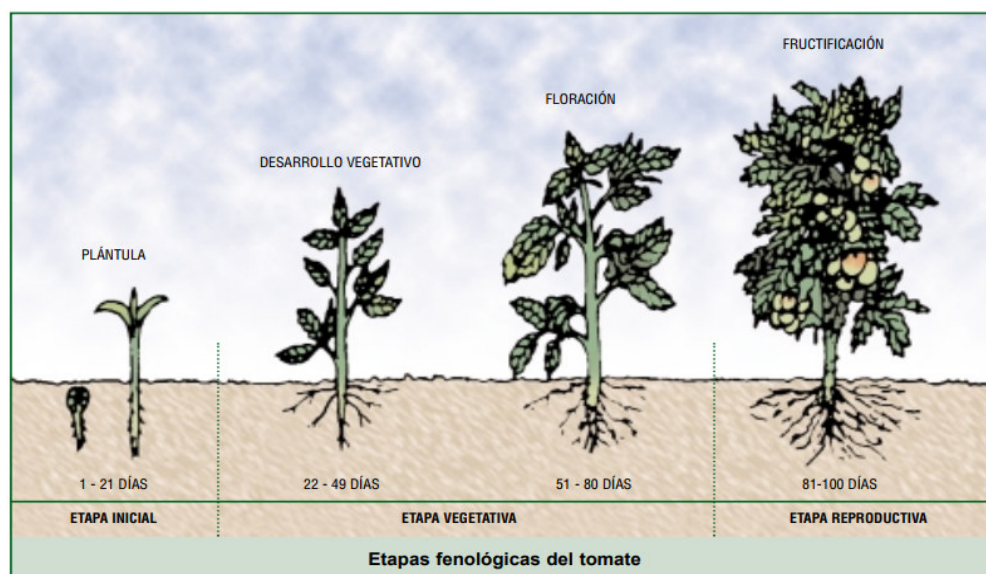


Figura 4: Etapas del ciclo de vida del Tomate.

Fuente: Manual de Cultivo de Tomate. CENTA

1.6 Cultivos hidropónicos

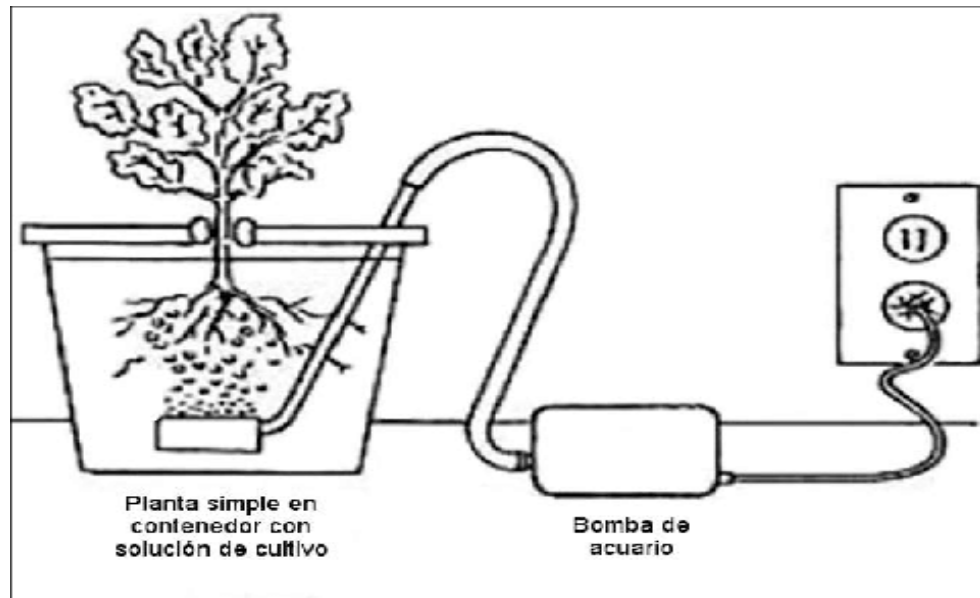
1.6.1 Hidroponía

La palabra deriva del griego “*hidro*” que significa agua y “*ponos*” que significa trabajo, al unificar las palabras sería “trabajar en agua”.

La hidroponía es una técnica de producción agrícola para cultivos en los cuales no se requiere el uso de suelos, debido a que se usa soluciones líquidas en los cuales se encuentran mezclados los diferentes nutrientes requeridos por las plantas (FAO, 2003).

La FAO viene dando una capacitación para el uso de hidroponía desde 1992 con el fin de mejorar la calidad de vida de comunidades de zonas urbanas y marginales, para garantizar el acceso de estas personas a alimentos sanos. La técnica ofrece muchas ventajas entre las que se puede mencionar: los cultivos producidos son sanos debido a que están libre de contaminantes, metales pesados, sustancias tóxicas, etc. El uso del agua es eficiente ya que se puede recircular. Ahorro de espacio, no se requieren áreas extensas para su elaboración, se puede realizar en techos, terrazas, patios, etc. Es una técnica fácil de realizar, de bajo costo y grandes beneficios. Se obtienen mayor

cantidad de plantas por superficie en comparación con el suelo, por ejemplo en un metro cuadrado de suelo se siembran 9 lechugas, y en esa misma medida en hidroponía se puede obtener hasta 25 plantas de lechugas. En la Figura 5 se muestra un diagrama simple de un sistema hidropónico.



Fuente: Tomado de Moreno, A. 2016.

Figura 5: Sistema hidropónico básico para el cultivo de tomate. Consta de una bandeja y una bomba de aire o compresor.

1.7 Biorremediación

La biorremediación es considerada como una de las más seguras, limpias, rentables y respetuosas tecnologías para descontaminar sitios con una amplia gama de contaminantes (Arpita *et al.*, 2014).

El termino fue acuñado en el año 1980 y deviene de la conjunción de dos palabras “bio” que implica el uso de organismos vivos y “remediación” implica procesos de limpieza, depuración, eliminación, saneamiento en tal sentido la biorremediación tal como se le conoce viene a ser el uso de los microorganismos para remediar o limpiar ambientes contaminados con diferentes sustancias vía degradación completa, remoción o secuestro como resultado del uso de agentes biológicos (Gutiérrez 2015).

1.7.1 PROCESOS DE BIORREMEDIACION

1.7.1.1 Bioaumentación

Consiste en la adición de microorganismos naturales, exóticos, adaptados, o modificados genéticamente; con diferentes capacidades con el objetivo de incrementar la capacidad degradativa de las poblaciones microbianas nativas del lugar (Torres, 2015).

1.7.1.2 Bioestimulación

Es la adición de nutrientes específicos al suelo o agua con el fin de estimular la actividad de los microorganismos nativos. La estimulación puede ser por nutrientes o por la adición de pequeñas cantidades de algún contaminante con el fin de que los microorganismos expresen sus mecanismos metabólicos y/o moleculares para la acción de biorremediación (Gutiérrez, 2015).

1.7.2 Interacción entre microorganismos y metales pesados

Los microorganismos poseen múltiples mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para remover metales en solución por oxidación, reducción, metilación y dimetilación las cuales pueden dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Buffle, 1987).

La transformación de metales pesados por microorganismos, sigue dos vías, que dependen principalmente de su estado de oxidación y la especie química que conforma. La primera vía es la inmovilización del metal, que consiste en el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida y la segunda vía es la movilización del metal, es decir el pasaje de un estado insoluble inicial (por ejemplo metales asociados a suelos, sulfuros u óxidos metálicos) correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa (Buffle, 1987).

1.7.2.1 Biosorción

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre. Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales (Kabata, 1995). Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante dos procesos, una bioacumulación o transporte al interior celular por diversos mecanismos y una interacción fisicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo (Gutiérrez 2015).

1.8 Levaduras y biorremediación

Las levaduras son células eucariotas, están ubicados dentro del reino de los hongos. Estos forman sobre los medios de cultivo colonias de diferentes tamaños y formas, algunas son pastosas, cremosas, cerosas, brillantes, etc. También en algunos géneros presentan pigmentación tal es caso del genero *Rodothorula* (Geoffrey *et al.*, 1999).

El estudio de las levaduras ha alcanzado límites inimaginables desde sus inicios, puesto que el avance en las técnicas moleculares ha permitido que se logre secuenciar el genoma completo, por ejemplo de las levaduras del genero *Saccharomyces*, el cual es usado ampliamente en Biotecnología (Subir *et al.*, 2018). Son múltiples los campos de aplicación de las levaduras, entre las que podemos destacar la industria farmacéutica, industria alimentaria principalmente en la producción de cervezas, vinos, quesos. Estos usos en alimentación se remontan hasta épocas muy antiguas, con el uso empírico de las levaduras para producir fermentos en el antiguo Egipto (Subir *et al.*, 2018). Las levaduras por su complejidad celular, por su facilidad de manejo, adaptabilidad a diferentes condiciones; y por las innumerables ventajas que ofrecen, se vienen aplicando en otros campos tal es caso de biotecnología ambiental, el cual hace uso de la capacidad metabólica de las levaduras para hacer frente a los diferentes problemas ambientales ocasionados por la contaminación antrópica.

Podemos mencionar el uso de las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Rodothorula sp.*; *Candida guilliermondi*; *Picchia sp.*, en procesos de tratamiento de aguas residuales, degradación de colorantes de la industria textil, en procesos de biosorción de metales pesados contaminantes de diferentes ambientes tanto suelos como aguas. También son usados en procesos de fertilización de suelos, debido a que las levaduras poseen la

capacidad de solubilización de fosfatos haciendo que el fósforo inorgánico sea más asimilable por las plantas (Xiao *et al.*, 2014)

1.8.1 Antecedentes de uso de levaduras en biorremediación de metales pesados

El uso de levaduras en el tratamiento de ambientes contaminados con metales pesados (MP), resulta en la biosorción de los agentes tóxicos por la biomasa celular y/o el transporte dentro de la célula, específicamente las levaduras, presentan una serie de vías metabólicas en las que se utilizan iones metálicos como co-factores para la activación de ciertas enzimas, formación de bases, de aminoácidos, proteínas, entre otros (Malik, 2013). Además se ha encontrado que existe una estrecha relación entre la tolerancia a los MP y la funcionalidad de la vacuola, debido al papel desempeñado por este orgánulo en el secuestro de metal dentro de la célula y la liquidación de las macromoléculas dañadas por el metal (Malik 2013).

Esta capacidad se ha estudiado en *Saccharomyces cerevisiae*, que acumula cromo, cadmio y otros metales. También se ha reportado una cepa de *Candida sp.* Resistente a Cromo (VI), una cepa de *Rhodospiridium sp.* aislada de desechos industriales y cepas silvestres de *Pichia guilliermondii* que fueron utilizadas en procesos de biorremediación de Cromo (III) y Cromo (VI) ya que presentan una alta tolerancia a dichos metales (Orbegozo *et al.*, 2008).

Algunas de las especies de levaduras en las que se ha encontrado resistencia a estrés por MP como Zn, Pb y Cd, aisladas de fuentes de contaminación directa, son por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula mucilaginosa* (Machado, 2008)

Una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa*, aislada de una fuente de contaminación directa, como el agua residual de la minería del Cu, presenta una alto grado de tolerancia al estrés generado por este metal, mediante el

desarrollo de varios mecanismos para mantener un equilibrio entre las concentraciones de metales intracelulares y la toxicidad contra el Cu presente en el medio (Moreta *et al.*, 2016)

1.9 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

La toxicología ambiental estudia los daños que causa una sustancia y/o contaminante sobre organismos frente a su exposición que se encuentra en el medio ambiente. El objetivo principal de la toxicología ambiental es evaluar los impactos que producen en la salud pública la exposición de la población a los tóxicos ambientales presentes en un sitio contaminado. Es conveniente recalcar que se estudian los efectos sobre los humanos, aunque pudieran existir, en el sitio de estudio, otros blancos de los tóxicos tales como microorganismos, plantas, animales, entre otros.

En la toxicología es importante diferenciar y tener en claro términos como **exposición** que se define como el contacto de una población y/o individuo a un agente químico o físico; y **blanco** se define como la parte del organismo que recibe el impacto toxico y genera una respuesta biológica dependiendo de la exposición

Existen varias maneras de caracterizar y medir la respuesta de los organismos frente a los tóxicos mediante parámetros toxicológicos. Cabe señalar que la toxicidad es una propiedad que depende de cada sustancia siendo unas más toxicas que otras y que su efecto depende del tiempo de exposición (Lee, 2005).

1.9.1 CONCENTRACION LETAL MEDIA CL₅₀

Es un parámetro toxicológico que indica una reducción del 50% la población inicial al ser expuesta a una sustancia o agente en un determinado periodo de tiempo. La prueba fue creada por J.W. Trevan en 1927, Los valores obtenidos mediante este parámetro sirven para estimar la concentración aproximada a la cual deben estar viables los organismos sin afectar a su población (Soares et al., 2003).

Habitualmente, la CL₅₀ de una sustancia se da en mg/kg de masa corporal o en mg/l según el organismo estudiado. La elección de la mortalidad del 50 % como prueba patrón evita la posible ambigüedad de hacer medidas en los extremos, y reduce la cantidad de pruebas requeridas. Sin embargo, esto también implica que la CL₅₀ no es la dosis mortal en todos los casos; en algunos casos pueden ser letales dosis menores, mientras que en otros hay supervivencia a dosis más altas que la CL₅₀ (Repetto *et al.*, 2009).

2. HIPÒTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÒTESIS

- **Hipótesis nula (H₀):** Las levaduras disminuyen la bioacumulación de Cadmio (Cd) en cultivos vegetales.
- **Hipótesis alternativa (H_A):** Las levaduras no disminuyen la bioacumulación de Cadmio (Cd) en cultivos vegetales.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de la biosorción de Cadmio empleando cepas de levaduras con capacidad de resistencia a Cd⁺², usando plantas de tomate *Solanum lycopersicum* L. como modelo biológico.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la capacidad de resistencia de levaduras a diferentes concentraciones de cadmio.
- Determinar la cinética de crecimiento (μ_x) de las levaduras.
- Determinar la concentración de letalidad media (CL₅₀) frente al Cd.
- Evaluar la capacidad de biosorción con biomasa viva.
- Evaluar la eficiencia de biosorción de cadmio en cultivos hidropónicos de tomate inoculadas con levaduras.
- Identificación molecular de las levaduras.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

- Cinco de levaduras aisladas de relaves mineros altoandinos impactadas por metales pesados que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos
- Plántulas de tomate de 20 días de cultivadas en soluciones hidropónicas.

3.2 Métodos

3.2.1 Reactivación y estudio cultural de las cepas de levaduras

La reactivación de las cepas fue realizada a partir de ceparios conservados a una temperatura de - 20 °C, en medio base (Breierová *et al.*, 2002) por 48 horas a 28 °C a 150 rpm de agitación. Posteriormente, luego de 48 horas fueron sembradas por estría en agar Yeast Peptone Glucose (YPG) pH 6,0 para verificar la pureza de la cepa y realizar estudios morfológicos de las colonias anotando las características de crecimiento en medio sólido tales como tamaño, color, borde, superficie, brillo, forma.

3.2.2 Evaluación de la resistencia al metal Cadmio

La resistencia frente al metal Cd se evaluó siguiendo la metodología según Breierová *et al.*, (2002), quienes emplearon un medio básico (MB) cuyos componentes se encuentran en el Anexo N° A, al cual se le adicionó sulfato de cadmio ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) a concentraciones de 5, 10, 25 y 50 ppm; se incubaron a 28 °C, 150 rpm por un periodo de 12 días con lecturas, cada 24 horas se observó la turbidez del medio y la formación del botón celular.

3.2.3 Ensayo de Concentración Letalidad Media - CLM50

Se empleó la metodología planteada por Soares et al., (2003); Yong *et al.*, (2008); Repetto *et al.*, (2009) y Muñoz *et al.*, (2012) con modificaciones según cada autor. La concentración letal media (CL50) se definió como la concentración del metal que la inhibe el crecimiento del 50% de la población inicial (control), para lo cual se realizaron ensayos de cinética de crecimiento para las cepas seleccionadas resistentes a Cd^{+2} . Se inició el cultivo de las cepas a partir de un inóculo al 10% (10^7 ufc/ml) y se incubaron a 28°C, 150 rpm de agitación por 48 horas en el medio YPG pH 6,0. Del cultivo en fase log se tomó 1ml y se inoculó en un tubo con 9ml de caldo YPG pH 6,0 (control), a partir de dicho tubo se tomaron 1ml y se inocularon a cada uno de los tubos restantes con 9ml de caldo YPG pH 6,0, con concentraciones crecientes de Cd^{+2} de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 ppm, finalmente todos los tubos fueron incubados durante 3 horas para determinar los efectos de citotoxicidad del metal cadmio. Finalmente se tomaron 1ml de cultivo de todos los tubos y se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , y se sembró 0.1 ml de la dilución por triplicado en agar YPG pH 6.0, para el recuento de las células viables y se confeccionaron las gráficas % células viables vs concentración de Cd^{+2} para determinar la CL_{50} de las cepas estudiadas.

3.2.4 Cinética de Biosorción de Cadmio

La cinética de biosorción de cadmio se realizó siguiendo la metodología propuesta por Tálos *et al.*, (2009), y se preparó una concentración de 40 mg/L de iones cadmio en un volumen total de 760 ml, a una agitación de 150 rpm a temperatura de 28 °C por un periodo de 110 horas, con tomas de muestra de 30 ml cada 12 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se analizó por espectrometría de absorción atómica en el laboratorio de Suelos y Aguas de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2.5 Análisis y cálculo del porcentaje de cadmio en sobrenadante de cultivo de levaduras

Para la determinación de la concentración de cadmio presente en el sobrenadante se usó el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica en el Laboratorio de Suelos, Aguas de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Para el cálculo del porcentaje de remoción de Cd se usó la fórmula siguiente propuesta por Zhang, *et al.*, (2014).

$$R = (Ci - Cf) / Ci \times 100$$

Dónde:

Ci: concentración inicial del metal en la solución (ppm).

Cf: concentración final del metal en la solución (ppm).

3.2.6 Cinética de Crecimiento

Los ensayos de cinética de crecimiento se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Vasudevan, (2003). Para lo cual se usó como medio de cultivo el Medio Base de Breierová *et al.*, (2002). Se tomaron muestras de 1ml por duplicado, en un intervalo de 2 horas y se diluyeron en solución salina estéril hasta 10^{-6} , se tomaron las últimas diluciones para sembrar por diseminación 0,1ml en placas con Agar YPG pH 6,0. Las placas fueron incubadas por 48 horas a 28 °C. Para el conteo de las colonias se usó la metodología ICMSF cap. 2000 empleada por DIGESA 2003 para recuento de mohos y levaduras. Las gráficas de la cinética crecimiento fueron tabuladas Ln (UFC/ml) vs Tiempo (horas)

3.2.7 Sistema Hidropónico

Para los ensayos correspondientes se siguió la metodología propuesta por Valdiviezo *et al.*, 2002 tal como se indican en los puntos siguientes:

3.2.7.1 Germinación de tomate

La germinación de las semillas de tomate se realizó sobre sustrato de arena, para lo cual se procedió a desinfectar y esterilizar la arena. Posteriormente se realizó el sembrado de las semillas a 0,5 cm de profundidad de la arena húmeda. Luego se procedió a dejarlos en ambiente oscuro entre 5 a 8 días.

Una vez que se observó la germinación de todas las semillas, se colocaron las bandejas en un ambiente con luz, para facilitar el crecimiento. A los 15 días de cultivado, se realiza el riego por aspersión con solución nutritiva 0,5% hasta que todas las hojas embrionarias de las plántulas se conviertan en hojas verdaderas.

3.2.7.2 Trasplante de las plántulas de tomate

Para el trasplante, se procedió a remover del sustrato a las plántulas de tomate con 20 días de crecimiento con ayuda de una espátula, teniendo cuidado de no romper las raíces. Las raíces de las plántulas fueron lavadas con agua destilada para remover la arena excedente.

3.2.7.3 Acondicionamiento de cultivos hidropónicos

Se prepararon 6 soportes de tecnopor de 45 x 26 cm para las plántulas, a cada uno se le realizó 5 agujeros de 2 pulgadas. Las plántulas fueron sujetadas por el tallo con esponjas para proporcionarles mayor estabilidad en los agujeros y las raíces fueron sumergidas en un volumen de 10 litros de solución hidropónica (5ml/L solución A y 5ml/L de solución B) contenidas en bandejas de 45 x 26cm. Se tomaron 50ml muestras de solución hidropónica de cada bandeja para determinar la concentración de Cd inicial y fueron enviadas al laboratorio de aguas y suelos de la UNALM. Posteriormente todas las bandejas fueron aireadas con ayuda de un compresor a razón de 6.5 litros/minuto durante 15 días.

3.3 Preparación de inóculo de levaduras

El inóculo de levaduras fue preparado a partir de cultivos de 48 horas aproximadamente en volúmenes de 500ml los cuales fueron lavadas con buffer

phosphate saline (PBS) pH 6,0 y acumuladas hasta obtener un recuento estimado de 1×10^{-9} UFC/ml, según lo propuesto por Amprayn *et al.*, (2012).

3.4 Evaluación de la eficiencia de biosorción de cadmio en cultivo hidropónico de tomate

Una vez acondicionado las plántulas en las bandejas y sumergidas en 10 ml de solución hidropónica, se procedió a adicionar la solución del metal cadmio (Cd) a una concentración final de 10 ppm a todas las bandejas con excepción del control. Se añadieron 10 ml de inóculo de las cepas de levaduras a todas las bandejas el primer día, posteriormente a los 5, 10, y 15 días de cultivadas las plántulas. Se realizaron los recuentos para obtener la viabilidad a las 12, 24, 36, 48, 72, 84 y 96 horas posterior a cada aplicación.

Cada bandeja fue rotulada de la siguiente manera: Control 1 (plantas + Solución hidropónica); Control 2 (plantas + 10 ppm de Cd); Tratamiento 1 (plantas + 10 ppm de Cd + inoculación independiente con las cepas: Cepa IM y la cepa 25.1); Tratamiento 2 (plantas + inoculación independiente con las cepas: Cepa IM y la cepa 25.1).

3.5 Análisis de Cd en tejidos de tomate y en solución hidropónica

Para el análisis de Cd en tejidos de tomate se procedió a cosechar luego de 15 días de iniciado en ensayo. Las plantas de tomate fueron divididas en 2 muestras, es decir, la primera muestra constaba de hojas más los tallos y la segunda muestra corresponde a las raíces, cada muestra fue realizada por triplicado. Las muestras fueron puestas en sobres de papel kraft, rotuladas adecuadamente y secadas a una temperatura de 60 – 70 °C por 24 – 48 horas en estufa.

Para el caso de las soluciones hidropónicas restantes se tomaron muestras de 50 ml de cada bandeja para determinar la concentración final de Cd. Posteriormente todas las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Aguas y Suelos de la Universidad Nacional Agraria la Molina para el análisis de cadmio en los tejidos.

4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS

Para la identificación de las cepas de levaduras empleadas en la presente investigación el equipo del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, contribuyo a cada uno de los pasos siguientes:

4.1 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de DNA genómico se cultivaron las levaduras en caldo YPG por 48 horas, pH 4.5 a 30°C. Las cinco cepas seleccionadas fueron lisadas siguiendo el protocolo de extracción THERMOFISHER SCIENTIFIC GENET JET DNA Purification KIT.

4.2 Amplificación por PCR de la región D1/D2 LSU

Para amplificar la región D1/D2 LSU de la subunidad 28S ribosomal de las cepas, se utilizó los iniciadores: **F63**: (5`-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3`) y **LR3**: (5`-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3`). Utilizando el siguiente protocolo de PCR: 3 min a 95°C; 35 ciclos por 30 s a 95°C (Denaturación), 35 ciclos por 30 s a 57 °C (alineamiento); 35 ciclos 45 s a 72 °C (extensión); y finalmente 5 min a 72°C. Los amplicones se corrieron en gel de agarosa al 2% para luego ser revelados en transiluminador de luz UV.

4.3 Secuenciación e Identificación Molecular

Los amplificados de ADN de los aislados y los iniciadores F63 y LR3 se enviaron a Molecular Cloning Laboratories (McLab) USA, California (<https://www.mclab.com/>) para secuenciar los amplicones. Las secuencias fueron visualizadas y ensambladas mediante el programa CAP3. (Huang y Madan, 1999). Posteriormente las secuencias se depositarán en la base de datos (BankIt) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>).

5 RESULTADOS

5.1 Reactivación y estudio cultural de las cepas de levadura

En la siguiente Tabla 1 se muestran las descripciones culturales de las cepas estudiadas. En las figuras se muestran los aspectos macroscópicos de las colonias de levaduras de 48 horas de crecimiento cultivadas en medio YPG pH 6.0 y sus morfologías microscópicas a través de las coloraciones con cristal violeta respectivas **figuras 5 al 9.**

Tabla 1. Características culturales de las cepas seleccionadas de levaduras

CEPA	TAMAÑO(mm)	COLOR	BORDE	SUPERFICIE	BRILLO
IM	5,2	Blanco	Regular, entero con filamentos	Rugoso, cerebroide	Opaco
25.1	3	Blanco	entero	Lisa, elevada	Brilloso
11.10.A	3	Blanco	entero	Lisa, elevada	Brilloso
11.10.X	4.5	Rojo coral	entero	Lisa, mucoide	brilloso
17.1.2	4.5	Rojo	entero	Lisa, mucoide	brilloso

Leyenda:

- Colonia grande: > 3 mm
- Colonia pequeña: < 3 mm

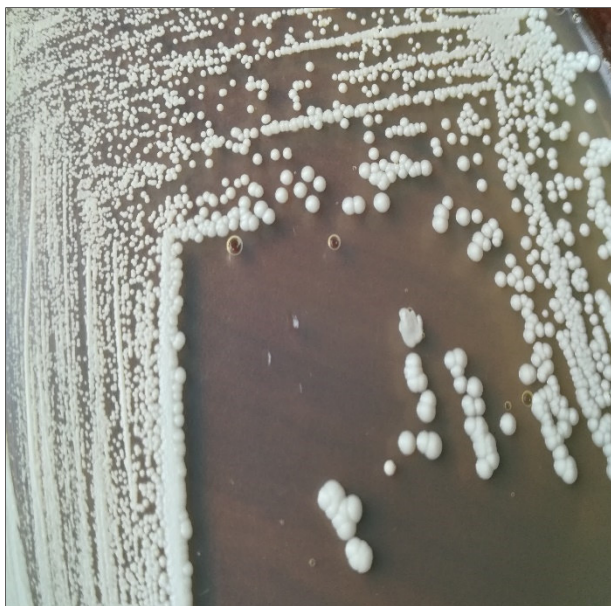


Figura 6 Colonias de la cepa 25.1, se puede notar que son blancas, pequeñas y circulares. Tiempo de incubación: 48h



Figura 6.1 Fotografía tomada a 20x de aumento de las colonias de la cepa 25.1, se puede notar que son blancas, pequeñas, brillosas y circulares.

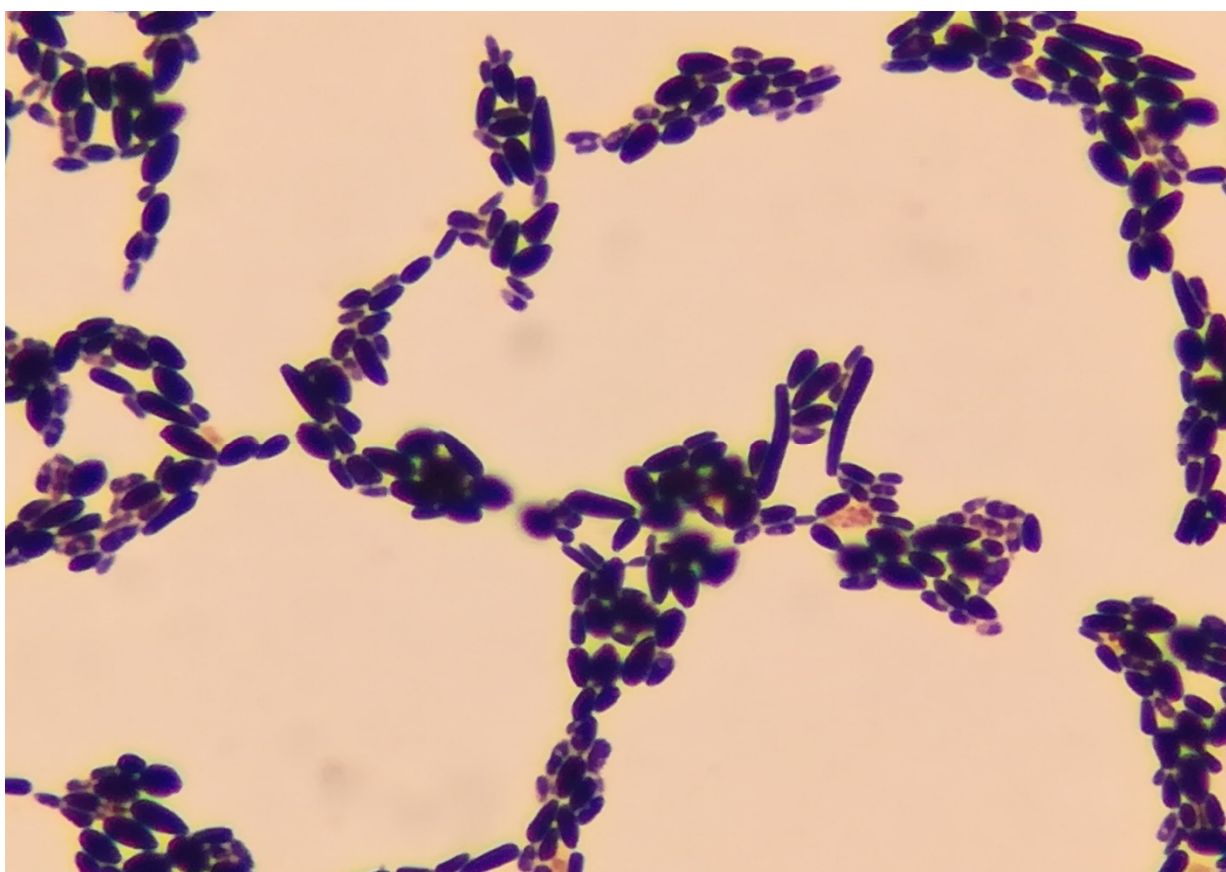


Fig. 6.2 Micrografía 1000x de la Coloración con cristal violeta de la cepa 25.1, se observa que son alargadas y abastionadas.

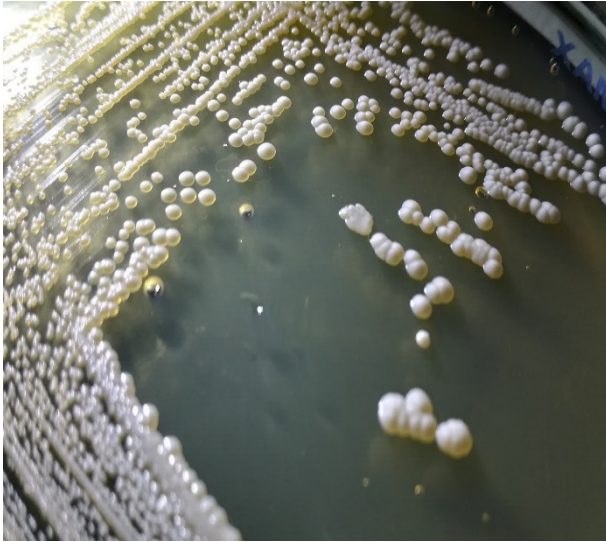


Figura 7: Colonias de la cepa 11.10.A, se puede notar que son blancas, pequeñas y redondas. Tiempo de incubación: 48h



Figura 7.1: Fotografía 20x de las colonias de la cepa 11.10.A, se puede notar que son blancas, pequeñas, brillosas, borde regular.

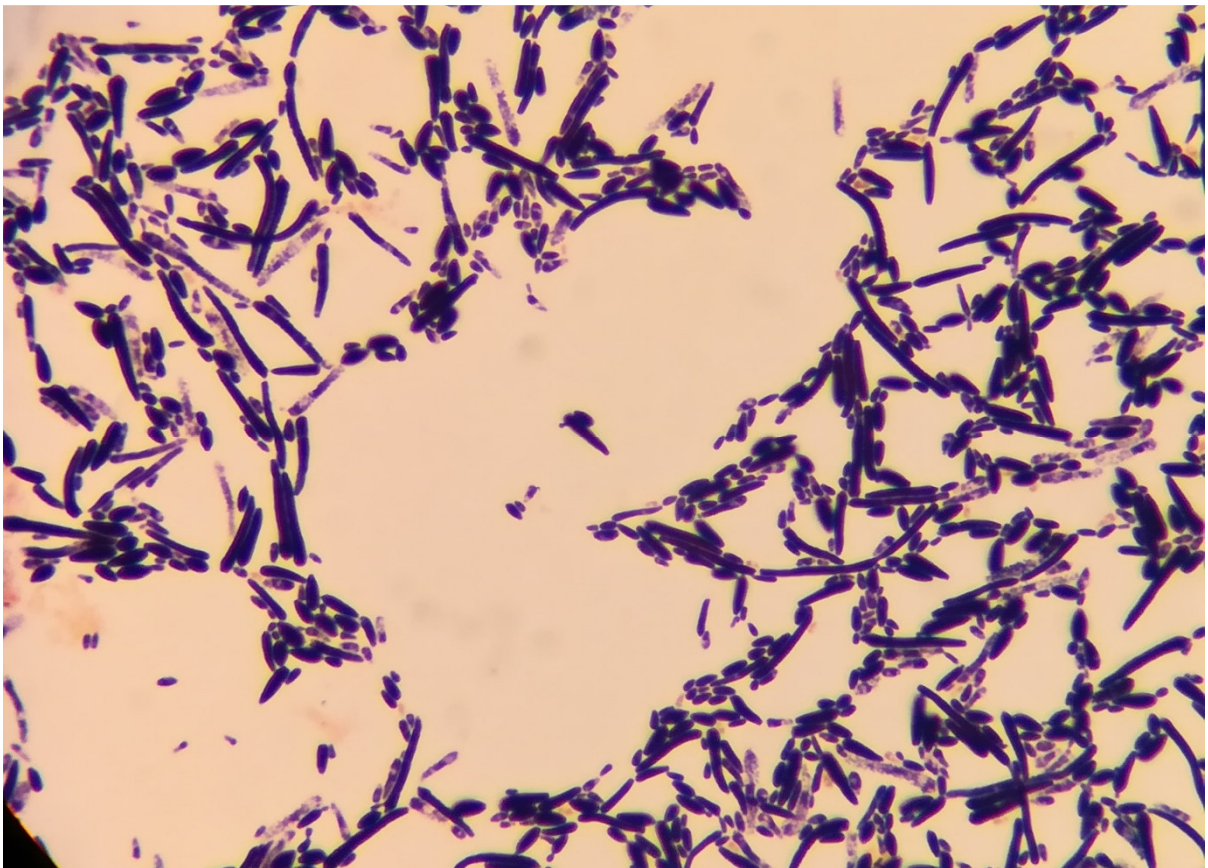


Fig. 7.2 Micrografía 1000x de la coloración con cristal violeta de la cepa 11.10.A, se observa que son alargadas y abastionadas.



Figura 8: Colonias de la cepa IM, se puede notar que son blancas, grandes y rugosas. Tiempo de incubación: 48h



Figura 8.1: Fotografía 20x de las colonias de la cepa IM, se puede notar que son blancas, grandes y su superficie presenta aspecto cerebroide.

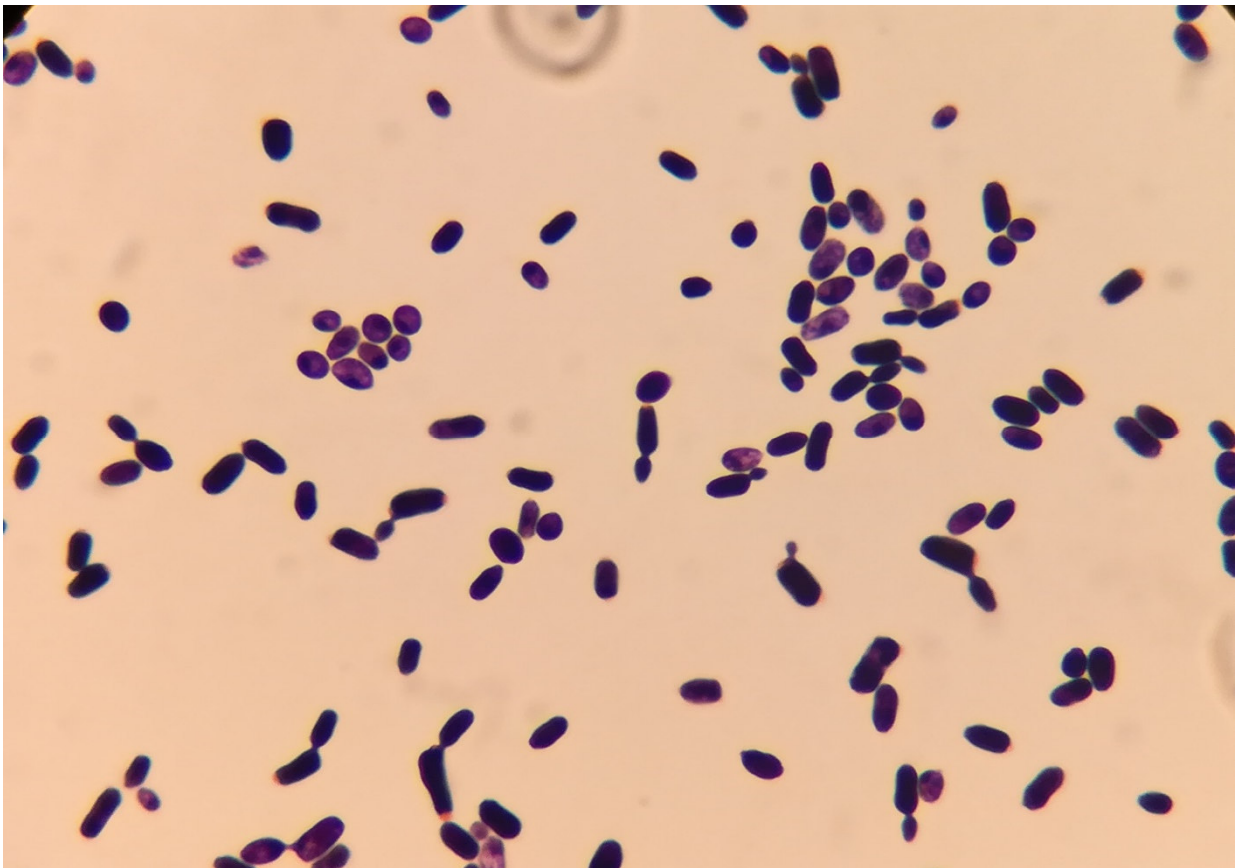


Fig. 8.2 Micrografía 1000x de la coloración con cristal violeta de la cepa IM, se observa levaduras en gemación, ovaladas a redondas.



Figura 9: Colonias de la cepa 11.10.X, se puede notar que son rosadas, grandes, lisas. Tiempo de incubación: 48h

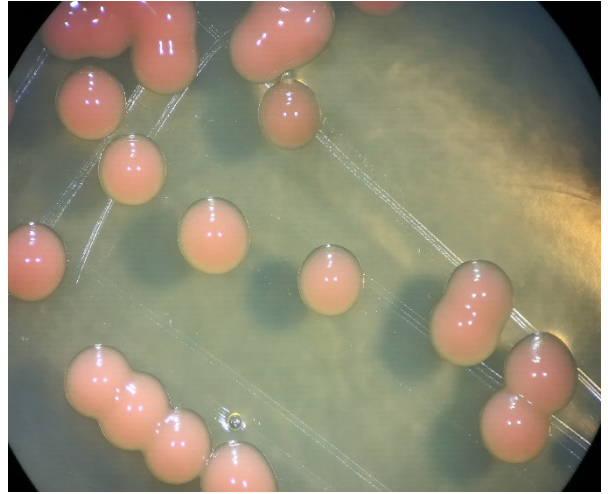


Figura 9.1: Fotografía 20x de las colonias de la cepa 11.10.X, se puede notar que son mucoides, rosadas, grandes y su superficie es lisa y brillante.

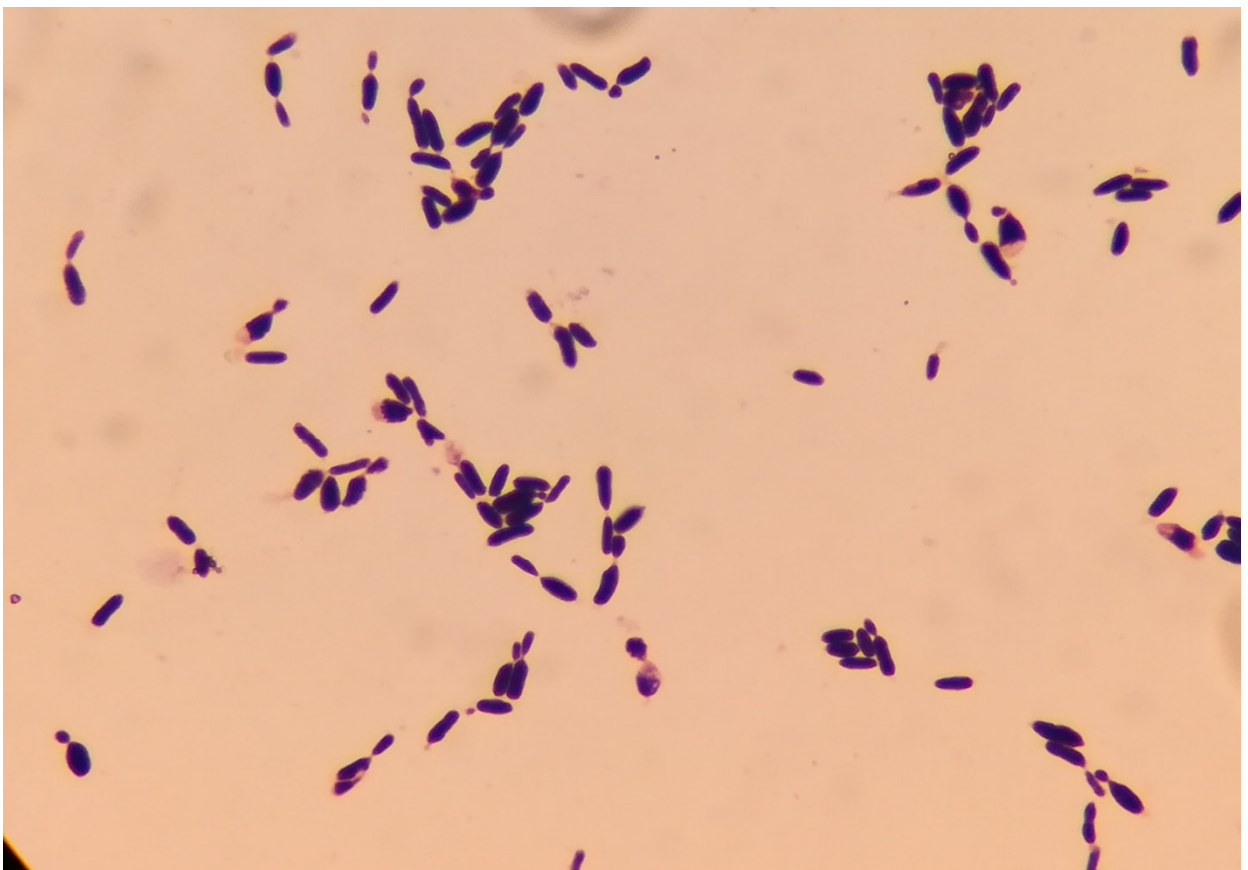


Fig. 9.2 Micrografía a 1000x aumentos de la coloración con cristal violeta de la cepa 11.10.X, se observa que las levaduras son pequeñas y alargadas.



Fig. 10: Colonias de la cepa 17.1.2, se puede notar que son colonias rosadas pálidas, pequeñas, lisas. Tiempo de incubación: 48h



Fig. 10.1: Fotografía 20x de las colonias de la cepa 17.1.2, se puede notar que son colonias mucoides, rosadas pálidas, pequeñas y su superficie es lisa, brillante.

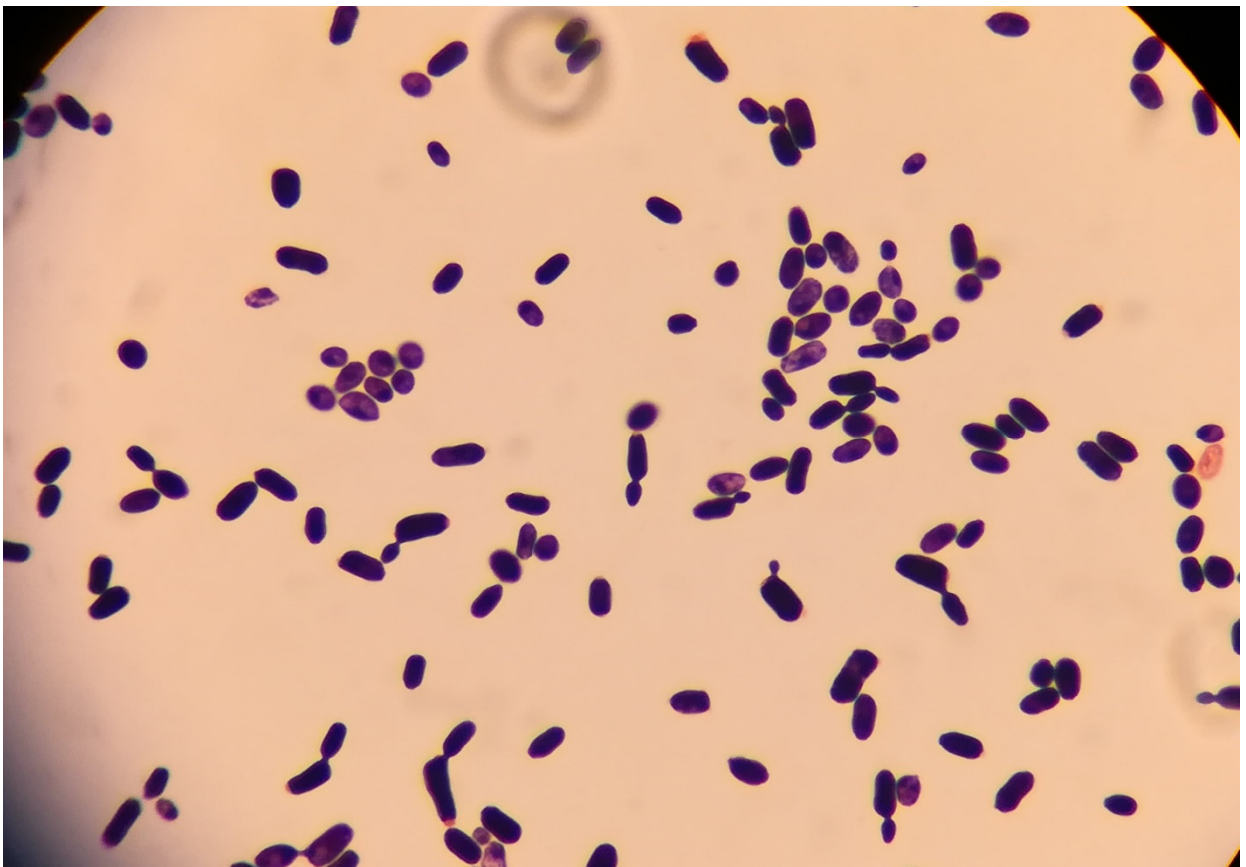


Fig. 10.2 Micrografía a 1000x aumentos de la coloración con cristal violeta de la cepa 17.1.2, se observa que las levaduras son pequeñas, redondas y ligeramente alargadas.

5.2 Evaluación de la resistencia a diferentes concentraciones de Cd^{+2}

A continuación se muestran en la Tabla 2, los resultados del ensayo de resistencia (tolerancia) de las cepas de levaduras estudiadas a cuatro diferentes concentraciones de cadmio por un periodo de 12 días. Las concentraciones de Cd^{+2} fueron de 5, 10, 25 y 50 ppm.

Tabla 2. Evaluación de la resistencia a cuatro concentraciones de Cd^{+2}

CEPA	LECTURA (DIAS)	CONCENTRACION (ppm)			
		5	10	25	50
IM	1	++	++	-	-
	2	+++	++	++	-
	3	+++	+++	+++	++
	4	++++	++++	++++	++
	6	++++	++++	++++	+++
	8	++++	++++	++++	++++
	10	++++	++++	++++	++++
11.10.A	12	++++	++++	++++	++++
	1	++	++	++	+
	2	+++	+++	+++	++
	3	+++	+++	+++	+++
	4	++++	++++	++++	++++
	6	++++	++++	++++	++++
	8	++++	++++	++++	++++
11.10.X	10	++++	++++	++++	++++
	12	++++	++++	++++	++++
	1	+++	++	+++	++
	2	++++	++++	++++	++++
	3	++++	++++	++++	++++
	4	++++	++++	++++	++++
	6	++++	++++	+++	++
17.1.2	8	++++	++++	++++	++++
	10	++++	++++	++++	++++
	12	++++	++++	++++	++++
	1	+++	+++	+++	++
	2	++++	+++	++++	+++
	3	++++	++++	++++	++++
	4	++++	++++	++++	++++
25.1	6	++++	++++	++++	++++
	8	++++	++++	++++	++++
	10	++++	++++	++++	++++
	12	++++	++++	++++	++++
	1	++	+	++	+
	2	++++	+++	++++	+++
	3	++++	+++	++++	+++

- Leyenda:** El crecimiento fue reportado con el símbolo (+); representa turbidez y formación de botón celular en el fondo del tubo.
- (+): Crecimiento tenue
- (++): Crecimiento leve
- (+++): Crecimiento moderado;
- (++++): Crecimiento abundante.

5.3 Concentración letal media (CL₅₀)

Se determinó la Concentración Letal Media (CL₅₀), para un periodo de exposición de 3 horas a diferentes concentraciones de Cd⁺² para todas las cepas estudiadas, reportándose que para las cepas IM; 11.10.A y la cepa 25.1 una concentración de 70 ppm de Cd⁺² produjo una disminución en 51,2; 50,9 y 52,1 % respectivamente la población inicial (**ver Figuras 11, 12 y 13**). Sin embargo, para la cepa 11.10.x una concentración de 60 ppm de Cd⁺² produjo una disminución en 51,9 % la población inicial y una concentración de 20 ppm produjo una disminución en 47,5% la población inicial de la cepa 17.1.2. (**Ver figuras 14 y 15**).

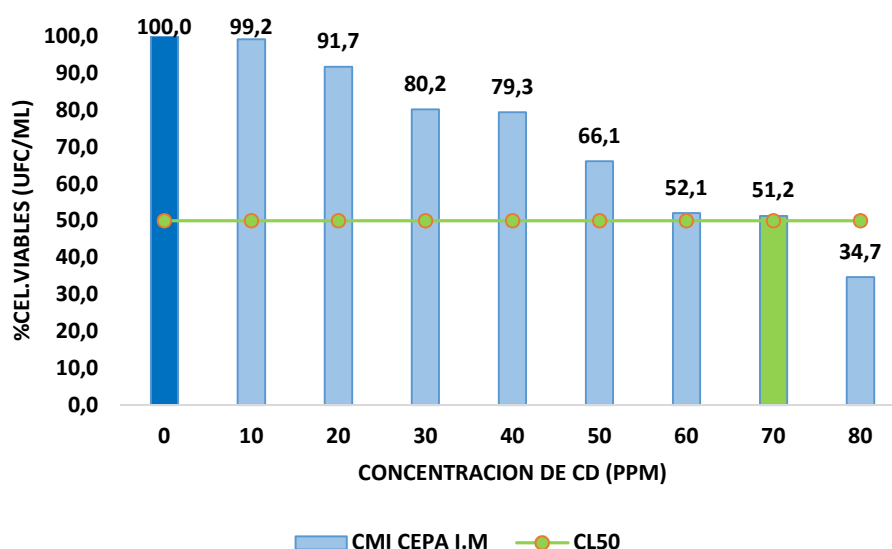


Figura 11: Se observa que para la CEPA IM una concentración de 70 ppm de Cd⁺² disminuye en 51,2 % (barra verde) la población con respecto a la población inicial (barra azul), es decir, la CL50 se encuentra a 70 ppm de Cd⁺² para una exposición de 3 horas.

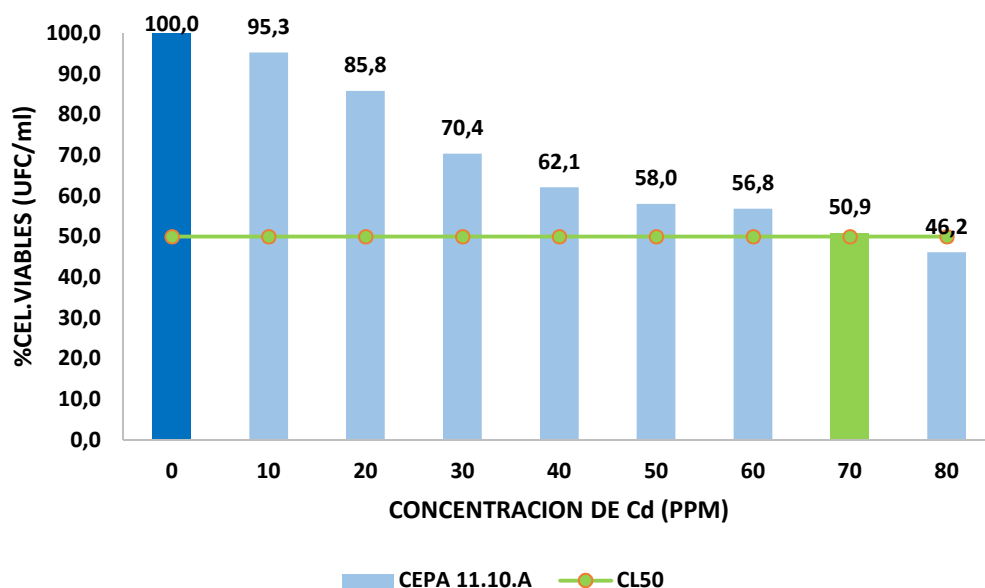


Figura 12: Se observa que para la CEPA 11.10.A una concentración de 70 ppm de Cd^{+2} disminuye en 50,9 % (barra verde) la población con respecto a la población inicial (barra azul), es decir, la CL50 se encuentra a 70 ppm de Cd^{+2} para una exposición de 3 horas.

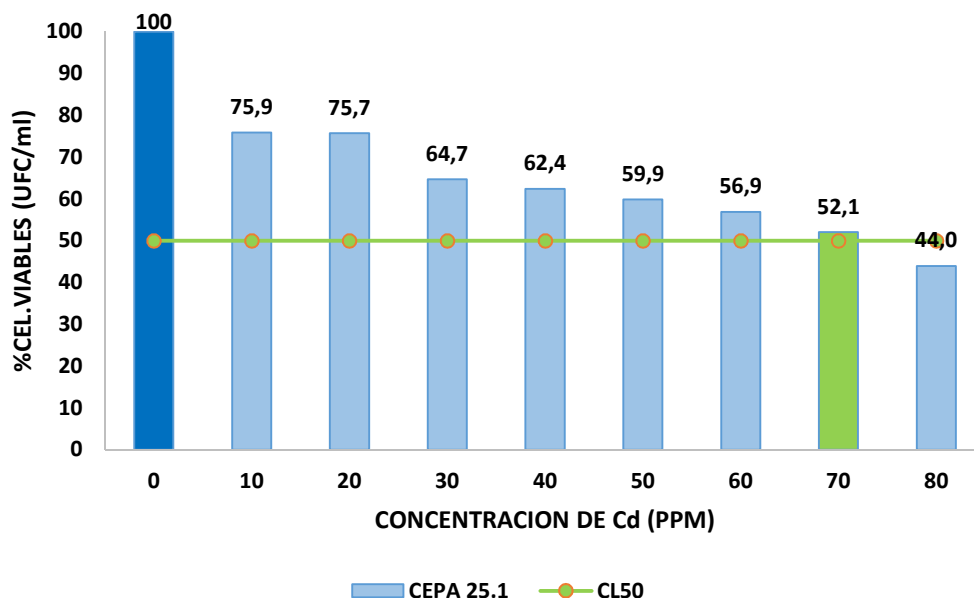


Figura 13: Se observa que para la CEPA 25.1 una concentración de 70 ppm de Cd^{+2} disminuye en 52,1 % (barra verde) la población con respecto a la población inicial (barra azul), es decir, la CL50 se encuentra a 70 ppm de Cd^{+2} para una exposición de 3 horas.

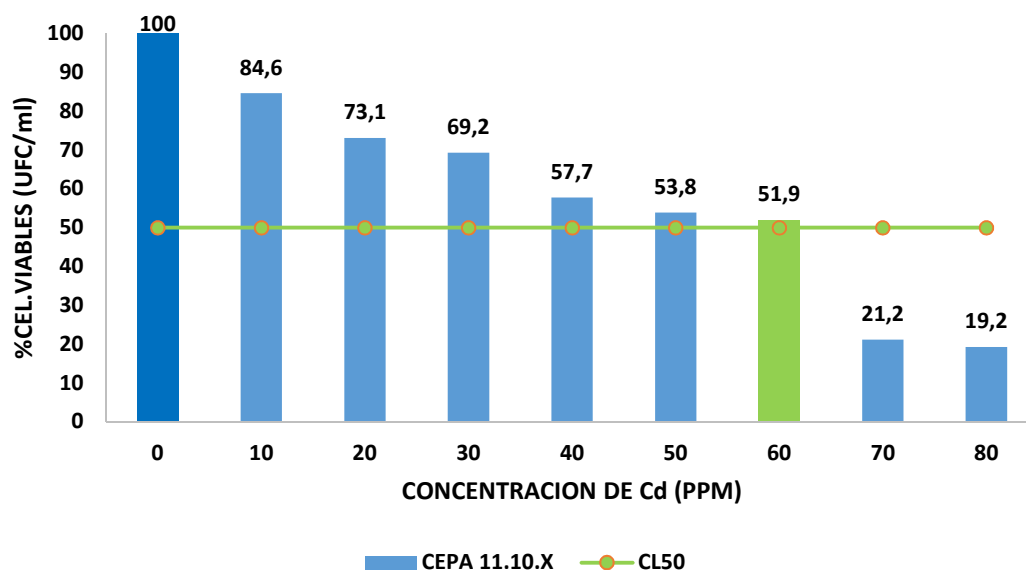


Figura 14: Se observa que para la CEPA 11.10.X una concentración de 60 ppm de Cd^{+2} disminuye en 51,9 % (barra verde) la población con respecto a la población inicial (barra azul), es decir, la CL50 se encuentra a 60 ppm de Cd^{+2} para una exposición de 3 horas.

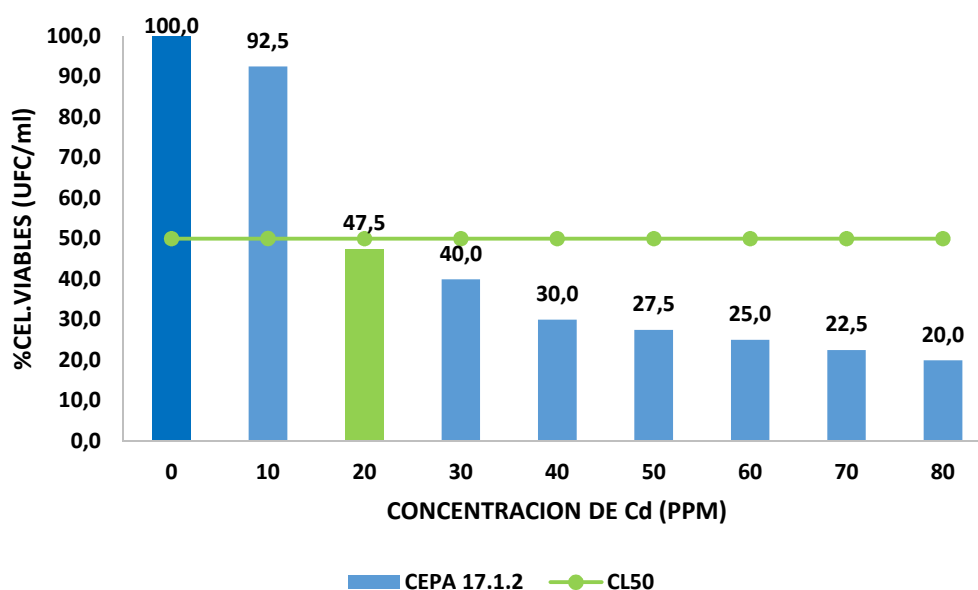


Figura 15: Se observa que para la CEPA 17.1.2 una concentración de 20 ppm de Cd^{+2} disminuye en 51,9 % (barra verde) la población con respecto a la población inicial (barra azul), es decir, la CL50 se encuentra a 20 ppm de Cd^{+2} para una exposición de 3 horas.

5.4 Cinética de crecimiento

Se realizaron las tabulaciones del Ln (ufc/ml) vs tiempo (horas) con los datos de los recuentos obtenidos para cada tiempo. Se observó que la cepa IM ingresa a su fase log entre las 18 y 24 horas y una permanencia en esta fase hasta las 36 horas con una tasa de crecimiento (μ) de 0.67 h^{-1} , siguiendo su fase estacionaria por un periodo de 24 horas y finalmente a las 60 horas inicia la fase de muerte celular (**Figura 16**). De manera similar la cepa 25.1 y 11.10.A, inician su fase log dentro de las 24 horas con una tasa de crecimiento (μ) de 0.14 h^{-1} y 0.016 h^{-1} respectivamente. (**Figuras 17 y 18**). Sin embargo, se observó en el presente estudio que las cepas 11.10.x y 17.2.1 presentaron una tasa de crecimiento (μ_x) de 0.03 h^{-1} y 0.9 h^{-1} respectivamente, esto debido a que se evidencio que dichas levaduras tardan aproximadamente entre 48 y 50 horas en alcanzar su fase log, prolongándose por 18 a 24 horas, terminando su fase de crecimiento en aproximadamente 7 a 8 días (**Figuras 18 y 19**)

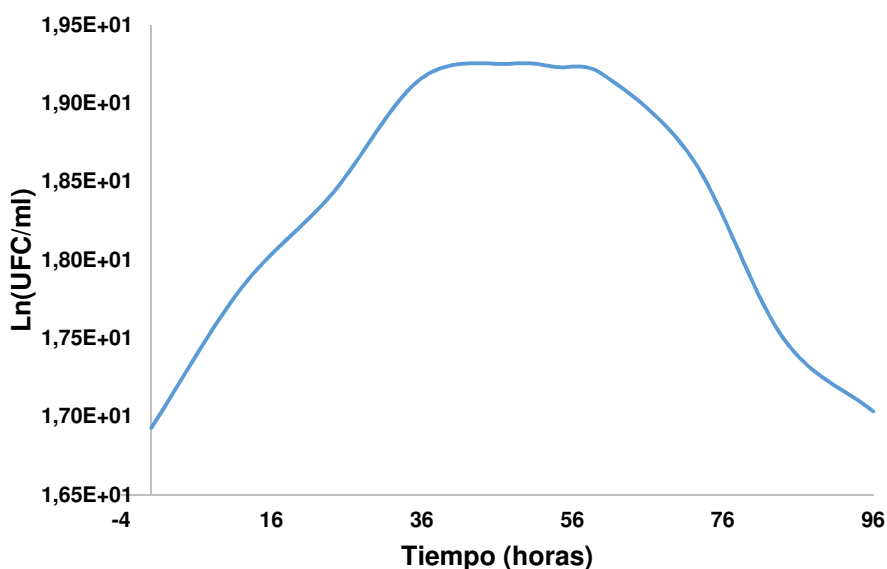


Figura 16: Cinética de crecimiento de la **cepa IM**. Fase log entre las 18 y 24 horas y una permanencia en esta fase hasta las 36 horas, durante la fase

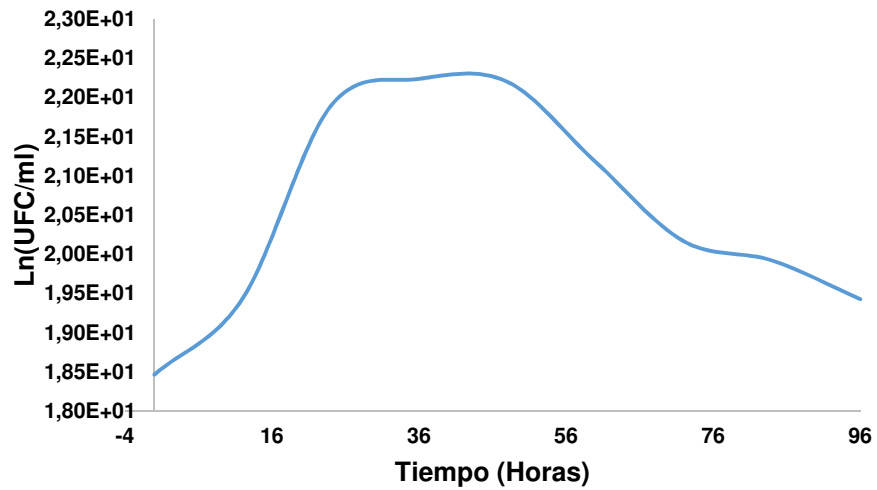


Figura 17: Cinética de crecimiento de la **cepa 25.1**. Fase log a las 24 horas y una permanencia en esta fase hasta las 36 horas. El tiempo de crecimiento fue de 96 horas.

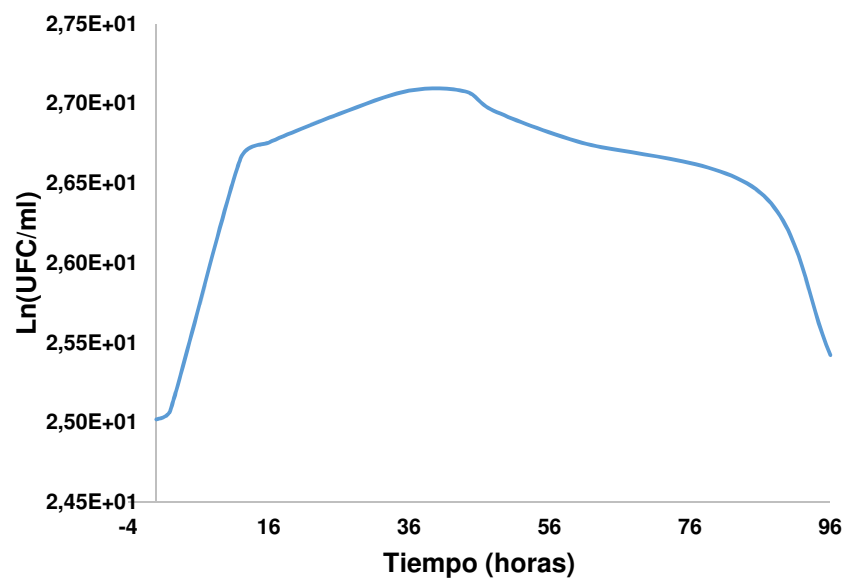


Figura 18: Cinética de crecimiento de la **cepa 11.10.A**. Fase log a las 24 horas y una permanencia en esta fase hasta las 36 horas. El tiempo de crecimiento fue de 96 horas.

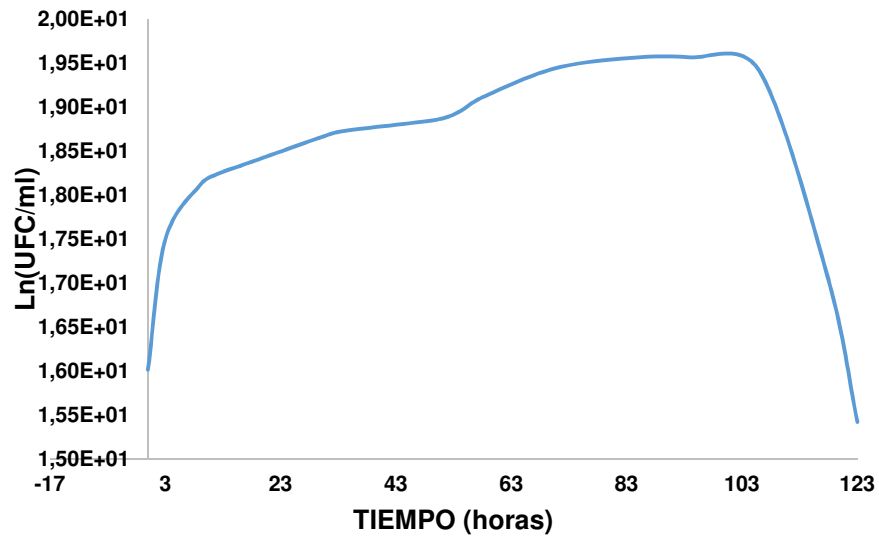


Figura 19 : Cinética de crecimiento de la **cepa 11.10.X**. Tarda aproximadamente entre 48 y 50 horas en alcanzar su fase log, prolongándose por 18 a 24 horas, terminando su fase de crecimiento en aproximadamente 7 a 8 días.

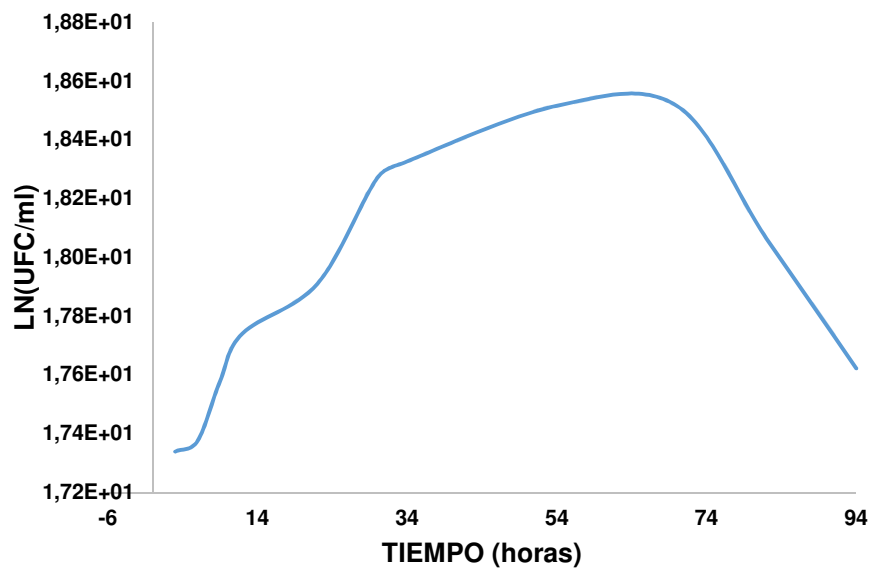


Figura 20: Cinética de crecimiento de la **cepa 17.1.2**. Tarda aproximadamente entre 48 y 50 horas en alcanzar su fase log, prolongándose por 18 a 24 horas, terminando su fase de crecimiento en aproximadamente 7 a 8 días.

5.5 Cálculo de la tasa de crecimiento (μ_x)

Se determinaron las tasas de crecimiento μ_x para cada una de las cepas a partir de una regresión lineal de la cinética de crecimiento usando la siguiente formula:

$$\mu_x = \frac{\ln X_f - \ln X_o}{T_f - T_o}$$

Donde:

Xo: población inicial; Xf: población final; To: tiempo inicial; Tf: tiempo final.

Los cálculos para cada una de las cepas de levaduras se resumen en la Tabla 3

Tabla 3. Tasa de crecimiento μ_x de las cepas de levaduras

CEPA	Tasa de crecimiento μ_x (h ⁻¹)
IM	0,67
25.1	0.14
11.10.A	0.016
17.1.2	0.02
11.10.X	0.01

Se puede evidenciar que la cepa IM tiene una mayor tasa de crecimiento respecto a las demás cepas (ver Figura 20), las cepas 25.1 y 11.10.A presentan tasas de crecimiento similares (Figura 21 y 22) por otra parte las cepas 17.1.2 y 11.10.X presentan las menores tasas de crecimiento (Figura 23 y 24) debido a su crecimiento lento prolongándose entre 7 y 8 días.

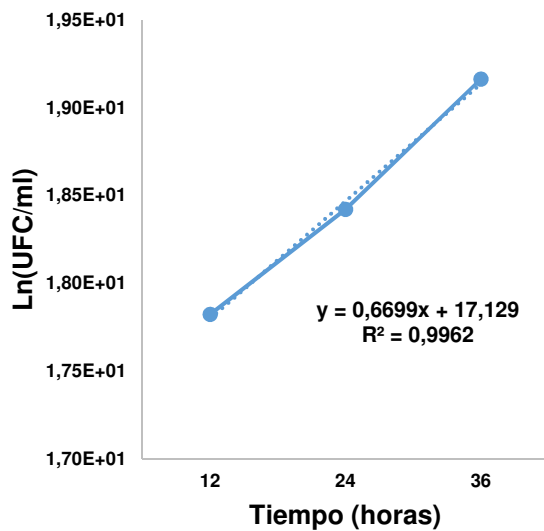


Figura 21: Tasa de crecimiento de la cepa IM. Igual a $0,67 \text{ h}^{-1}$

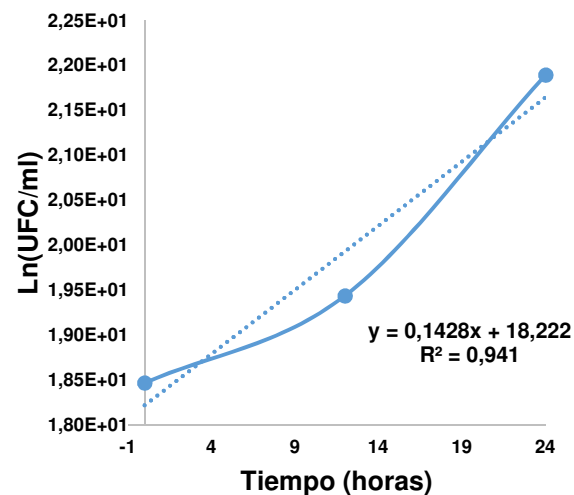


Figura 22: Tasa de crecimiento de la cepa 25.1 Igual a $0,14 \text{ h}^{-1}$

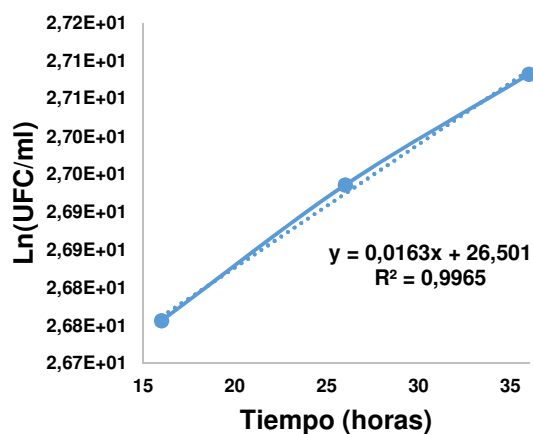


Figura 23: Tasa de crecimiento de la cepa 11.10.A. igual a $0,016 \text{ h}^{-1}$

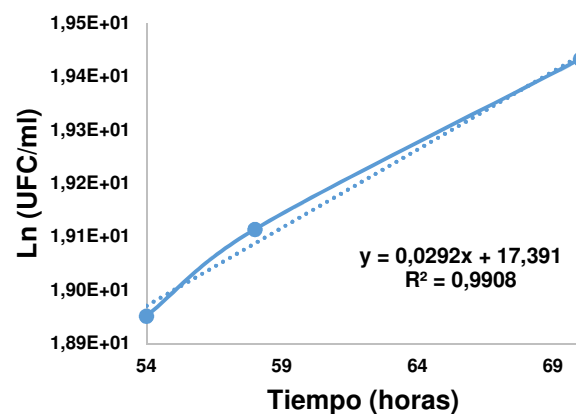


Figura 24: Tasa de crecimiento de la cepa 11.10.X. Igual a $0,02 \text{ h}^{-1}$

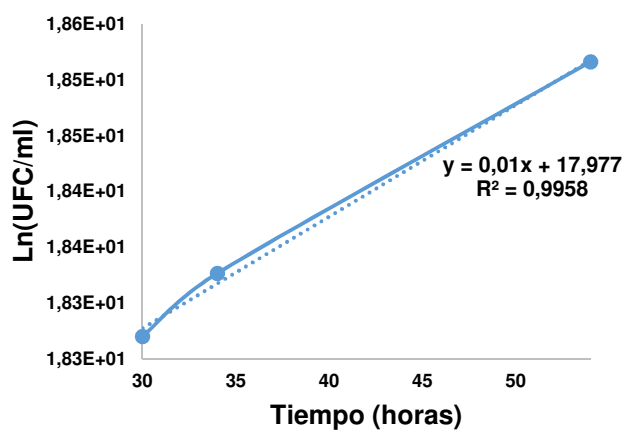


Figura 25: Tasa de crecimiento de la cepa 17.1.2. Igual a $0,01 \text{ h}^{-1}$

5.6 Cinética de crecimiento con Cd^{+2} (40 ppm)

Se determinaron las cinéticas de crecimiento frente a una concentración de 40 ppm de Cd para cada una de las cepas por un total de 96 horas. Se muestra las gráficas del Ln (UFC/ml) vs tiempo en horas. La cepa 25.1 (Figura 26) alcanza su fase logarítmica entre las 28 y 30 horas con una duración aproximada de 12 horas, concluyendo a las 50 horas aproximadamente. Del mismo modo la cepa 11.10.A (Figura 27) ingresa a su fase logarítmica aproximadamente a las 28 y 30 horas prolongándose hasta las 90 horas.

Por su parte la cepa IM (Figura 28), inicia su fase de crecimiento exponencial tempranamente entre las 18 horas prolongándose hasta las 40 horas aproximadamente, esta cepa tiene un rápido crecimiento frente al metal Cd, con una fase estacionaria más larga de 30 horas, finalizando a las 70 horas.

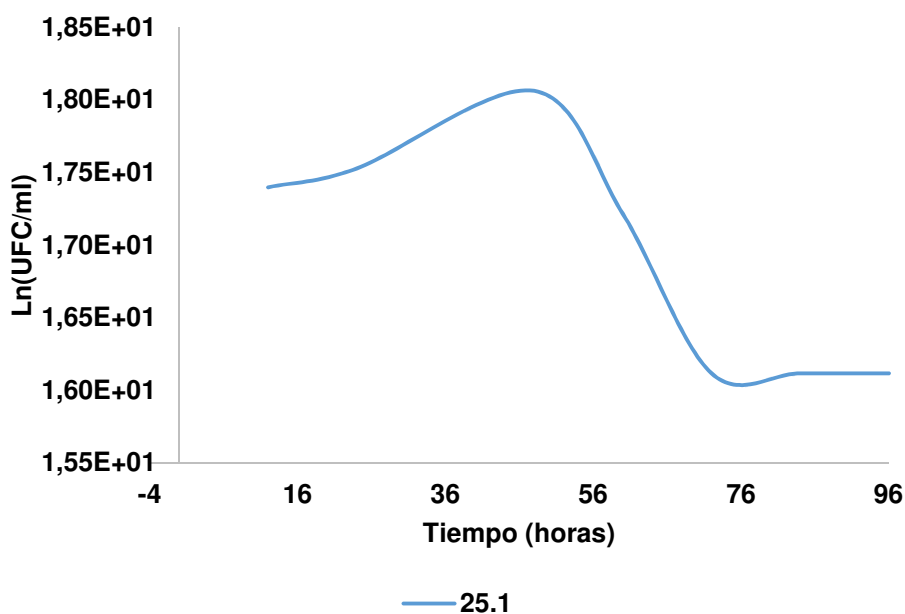


Figura 26: cinética de crecimiento de la cepa 25.1 a 40 ppm de Cd, la cepa inicia su fase logarítmica aproximadamente a las 28 horas y dura hasta las 50 horas.

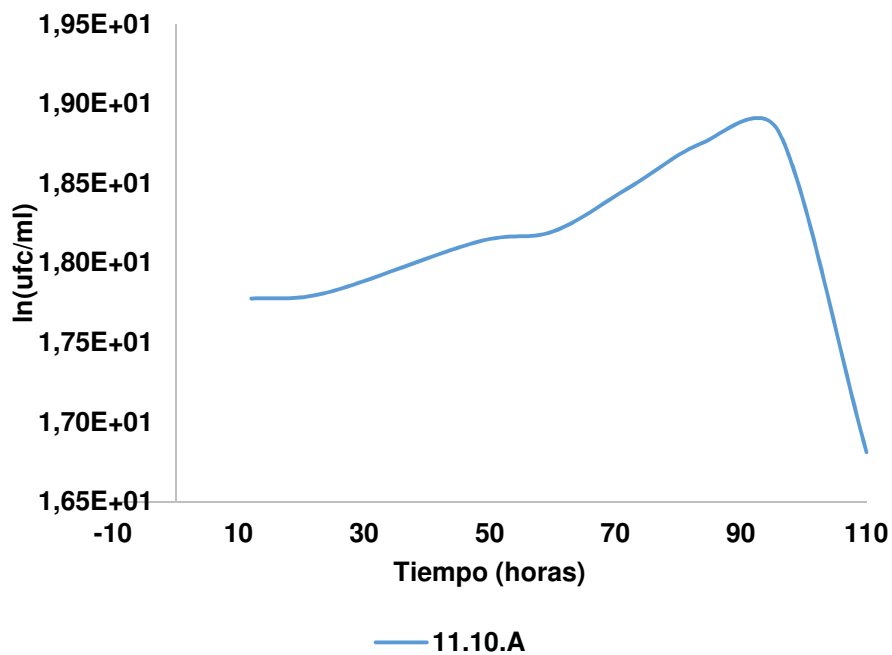


Figura 27: Cinética de crecimiento de la cepa 11.10.A a 40 ppm de Cd, la cepa ingresa a su fase logarítmica aproximadamente a las 28 y 30 horas prolongándose hasta las 90 horas.

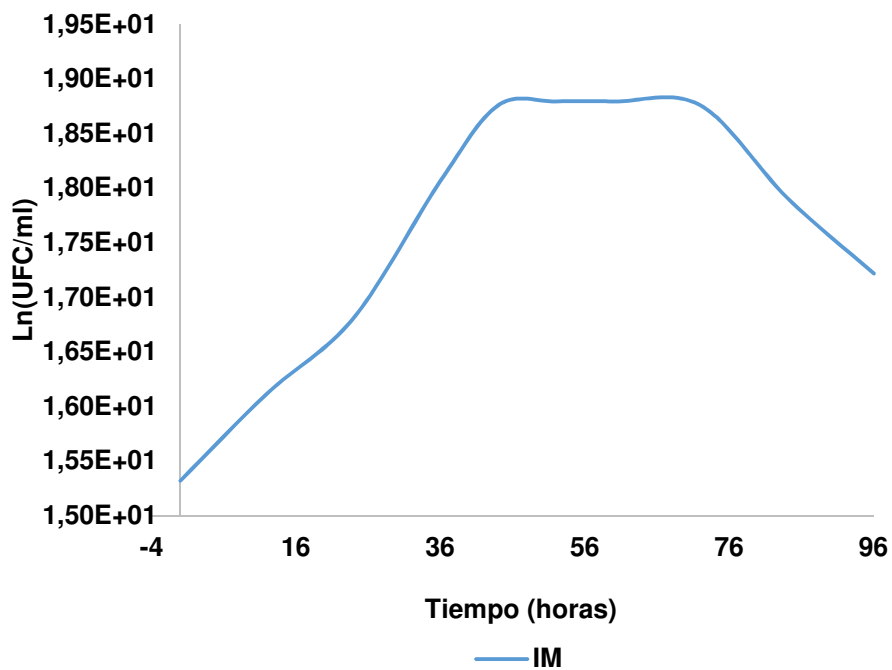


Figura 28: Cinética de crecimiento de la cepa de la cepa IM. La cepa inicia su fase de crecimiento exponencial tempranamente entre las 18 y 24 horas prolongándose hasta las 36 aproximadamente.

5.7 Calculo de la tasa de crecimiento frente a 40 ppm de cadmio

Se determinaron las tasas de crecimiento μ_x de las cepas de levaduras frente a 40 ppm de Cd. La cepa IM presenta una tasa de crecimiento de 0.09 h^{-1} (Figura 29), la cepa 25.1 presento una tasa de crecimiento de 0.019 h^{-1} (Figura 30) y finalmente la cepa 11.10.A presento una tasa de crecimiento de 0.01 h^{-1} (Figura 31).

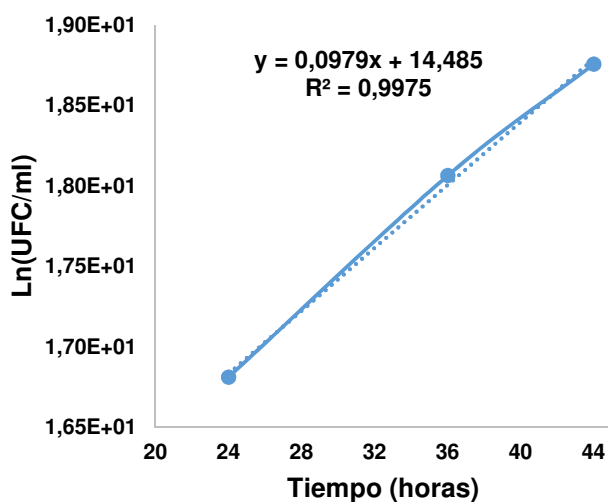


Figura 29: Tasa de crecimiento de la cepa IM. Igual a 0.097 h^{-1}

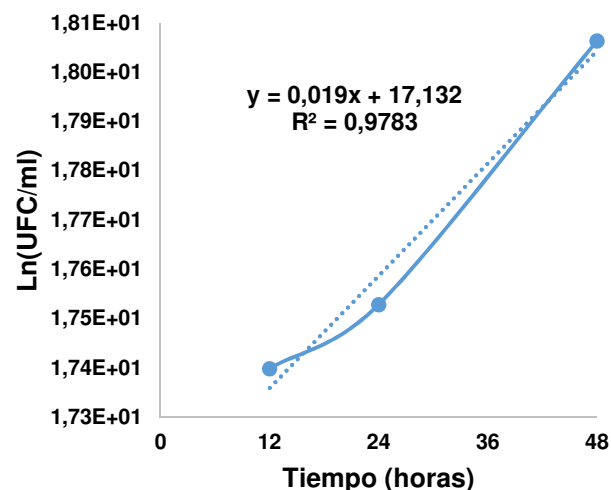


Figura 30: Tasa de crecimiento de la cepa 25.1. Igual a 0.019 h^{-1}

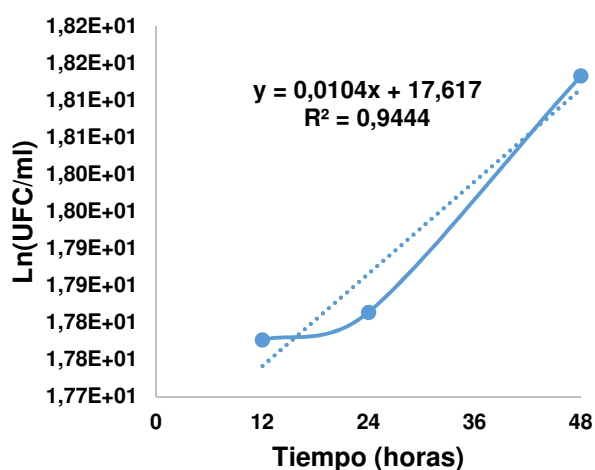


Figura 31: Tasa de crecimiento de la cepa 11.10.A. Igual a 0.01 h^{-1}

5.8 Cinética de biosorción

A continuación se presentan las gráficas de las cinéticas de biosorción de las cepas de levaduras 11.10.A, 25.1 y IM. Todas las cepas fueron sometidas a una concentración de 40 mg/l de Cd por un periodo de tiempo de 96 horas.

Se puede notar que aproximadamente a las 60 horas se alcanzan los mayores porcentajes de biosorción de Cd, con 51.47% para la cepa 11.10.A, Figura 32 y 52,0% para la cepa 25.1, (Figura 33). Por otro lado la cepa IM presentó un alto porcentaje de remoción de Cd con un 64.2% de remoción de Cd a las 60 horas (Figura 34), los resultados de biosorción de las 03 cepas se muestran en la Tabla 4.

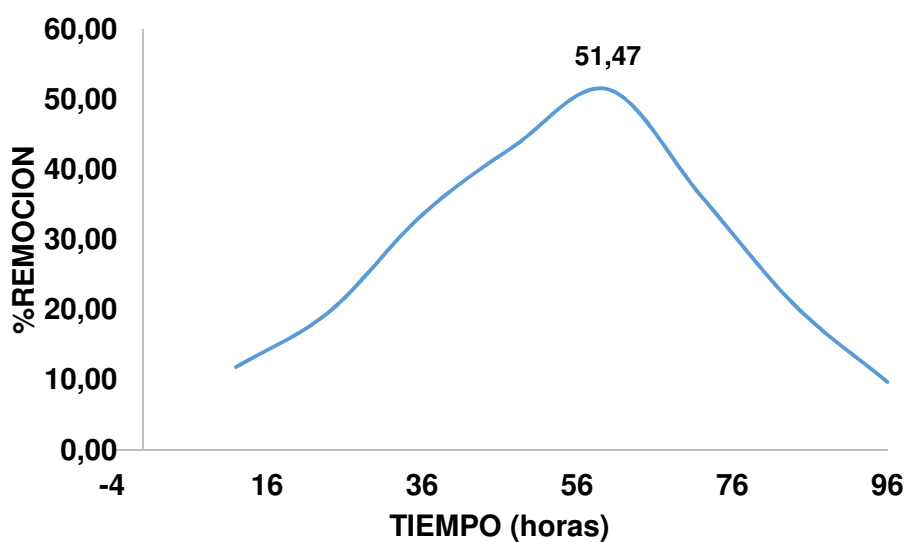


Figura 32: Cinética de biosorción de la cepa 11.10.A. Se observa que hay un incremento en el porcentaje de remoción de Cd con el paso del tiempo. Se observa que a las 60 horas se da una biosorción máxima de 51.47%.

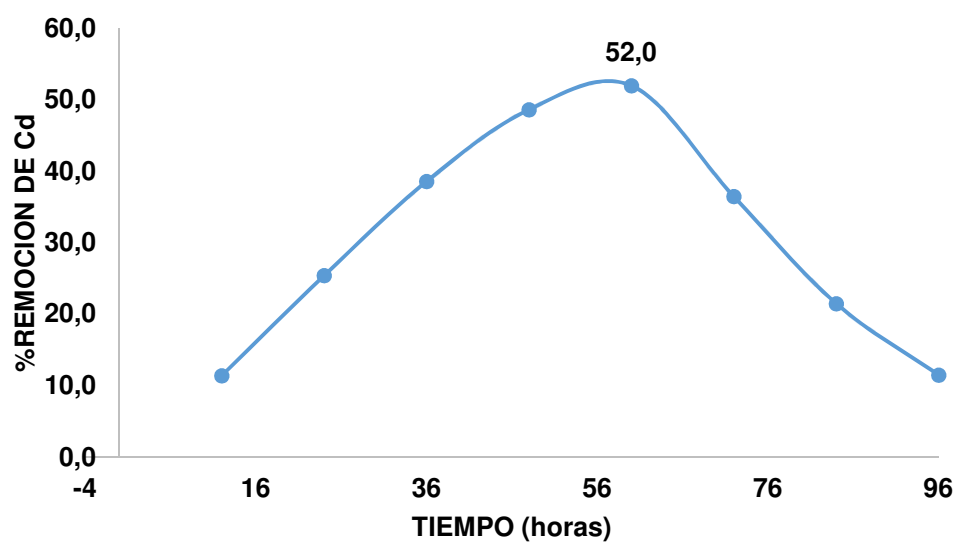


Figura 33: Cinética de biosorción de la cepa 25.1. Se observa que hay un incremento en el porcentaje de remoción de Cd con el paso del tiempo. Se observa que a las 60 horas se da una biosorción máxima de 52.0%.

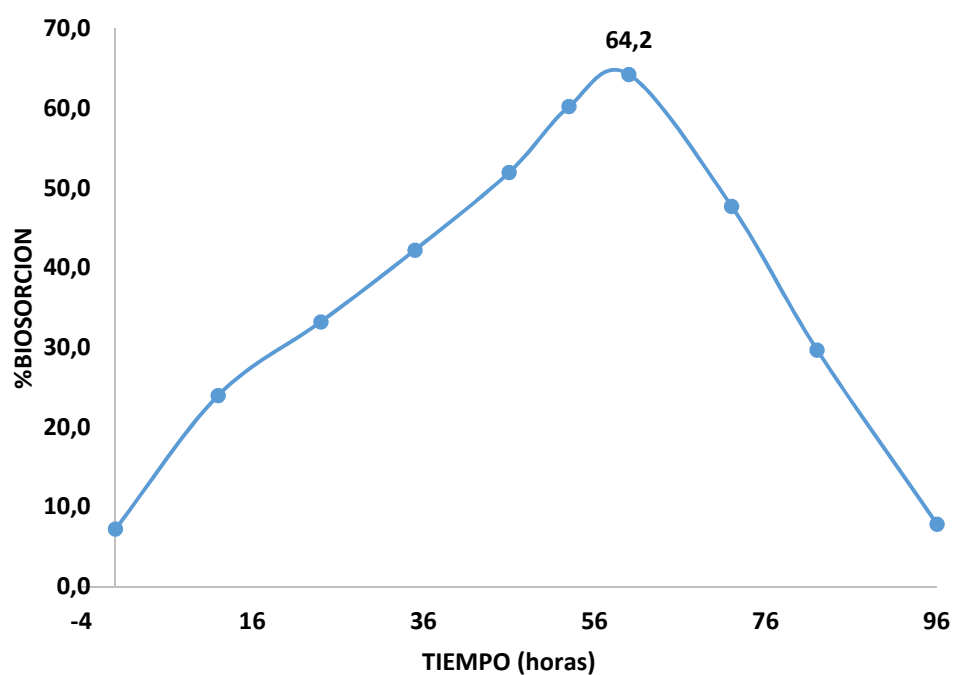


Figura 34: Cinética de biosorción de la cepa IM. Se observa que hay un incremento en el porcentaje de remoción de Cd con el paso del tiempo. Se observa que a las 60 horas se da una biosorción máxima de 64,2 % a las 60 horas.

5.9 Porcentaje de remoción de cadmio

En la siguiente tabla se puede apreciar los porcentajes de remoción de Cd de las cinéticas de crecimiento de cada una de las cepas de levaduras en función del tiempo. Las cepas 11.10.A y 25.1 remueven un máximo de 51,47 % y 52,0% respectivamente a las 60 horas de incubación. Mientras que la cepa IM remueve un 64,2% a las 60 horas de incubación siendo la cepa que presenta el mayor porcentaje de remoción de iones cadmio de la solución.

Tabla 4: Porcentaje de biosorción de Cd^{+2} con 3 cepas de levaduras en medio base con 40 ppm de Cd^{+2} .

CEPA	Concentración del metal en medio base (ppm)	Tiempo (horas)	Concentración de metal en el sobrenadante (ppm)	Biosorción por las cepas (ppm)	Porcentaje de biosorción (%)
11.0.A	Cd^{+2} 40 ppm	12	35,25	4,75	11,88
		24	32,10	7,90	19,75
		36	26,57	13,43	33,58
		48	22,60	17,40	43,50
		60	19,41	20,59	51,47
		72	25,50	14,50	36,25
		84	31,70	8,30	20,75
		96	36,10	3,90	9,75
25.1	Cd^{+2} 40 ppm	12	35,43	4,6	11,4
		24	32,45	10,2	25,4
		36	24,57	15,4	38,6
		48	20,55	19,5	48,6
		60	19,21	20,8	52,0
		72	25,40	14,6	36,5
		84	31,40	8,6	21,5
		96	35,40	4,6	11,5
IM	Cd^{+2} 40 ppm	12	30,40	9,60	24,0
		24	26,71	13,29	33,2
		35	23,11	16,89	42,2
		46	19,22	20,78	52,0
		53	15,91	24,09	60,2
		60	14,31	25,70	64,2
		72	20,91	19,09	47,7
		82	28,12	11,88	29,7
		96	36,85	3,15	7,9

5.10 Biosorción de cadmio por levaduras en cultivo hidropónico

Se presentan los resultados de los ensayos para la evaluación de la eficiencia de biosorción del ion Cd^{+2} en cultivos hidropónicos de tomate con 2 cepas de levaduras (cepa IM, cepa 25.1) seleccionadas previamente por su tolerancia, CL50 y porcentaje de biosorción de cadmio (Cd^{+2}) en medio YPG.

5.10.1 Determinación de la concentración del ion Cd^{+2} en tejidos de tomate.

En la Tabla 5 se presenta el resumen de los resultados obtenidos.

- El control 1 corresponde a las plantas + solución hidropónica, se puede apreciar que no hay acumulación de Cd^{+2} en ninguna estructura de las plantas de tomate.
- En el caso del control 2 (Plantas + metal) la concentración inicial en la solución hidropónica de 10 ppm de Cd^{+2} la concentración final en la solución hidropónica es de 5,79 ppm y, la capturada de Cd^{+2} por la planta es de 4,08 ppm, que representa el 41,33% de acumulación de Cd^{+2} , la menor acumulación fue de 1,75 ppm en tallos-hojas y 2,33 ppm de Cd^{+2} en raíces.
- Por otra parte, para el caso de las plantas de la bandeja inoculadas con la cepa IM se determinó una concentración final 7,31 ppm de Cd^{+2} , con una acumulación menor en los tejidos vegetales. Esto significa que las plantas inoculadas con la cepa IM acumularon un total de 2,59 ppm de Cd^{+2} , representa el 26,19 % de biosorción de Cd^{+2} , acumulando 0,34 ppm en tallos-hojas y 2,25 ppm en raíces.
- En el caso de las plantas inoculadas con la cepa 25.1, la concentración final de Cd^{+2} en la solución hidropónica fue de 6,68 ppm. Esto quiere decir que las plantas absorbieron un total de 2,88 ppm de Cd^{+2} que representa el 30,13% de absorción de Cd^{+2} , de los cuales fueron acumulados 0,50 ppm en tallos-hojas y 2,38 ppm de Cd en raíces tal como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentración de Cd⁺² en tomate

CODIGO	Concentración (ppm) Inicial de Cd en Solución Hidropónica	Concentración Final (ppm) de Cd en Solución Hidropónica	Concentración de Cd en Tallos –hojas (mg/kg)	Concentración de Cd en Raíz (mg/kg)	Cd Total acumulado en plantas (mg/kg)	Porcentaje (%) de acumulación de Cd ⁺² por planta
Control_1	0	0	0	0	0	0
Control_2	10	5,79	1,75	2,33	4,08	41,33%
IM	10	7,31	0,34	2,25	2,59	26,19%
25.1	10	6,68	0,50	2,38	2,88	30,13%

Fuente: Elaboración propia

Las Figuras 35 y 36 muestran los resultados obtenidos luego del procesamiento estadístico con el Software StataMP ver. 14 de las medias de la concentración de Cd⁺² determinado tanto en tallos-hojas y raíces.

Se puede apreciar que las plantas del control 2 acumularon en promedio 1.75 ppm de Cd⁺² en tallos-hojas con respecto a las plantas que fueron tratadas con levaduras IM y 25.1 que acumularon en tallos un promedio de 0.34 ppm y 0.50 ppm respectivamente que es menor en comparación con el control.

De la misma manera en la Figura 36 se puede apreciar la acumulación del ion Cd⁺² en las raíces de las plantas del control 2 que tuvieron una media de 2,33 ppm en total y las raíces de las plantas que fueron inoculadas con las levaduras IM y 25.1 cuyas medias fueron de 2,25 ppm y 2,38 ppm respectivamente.

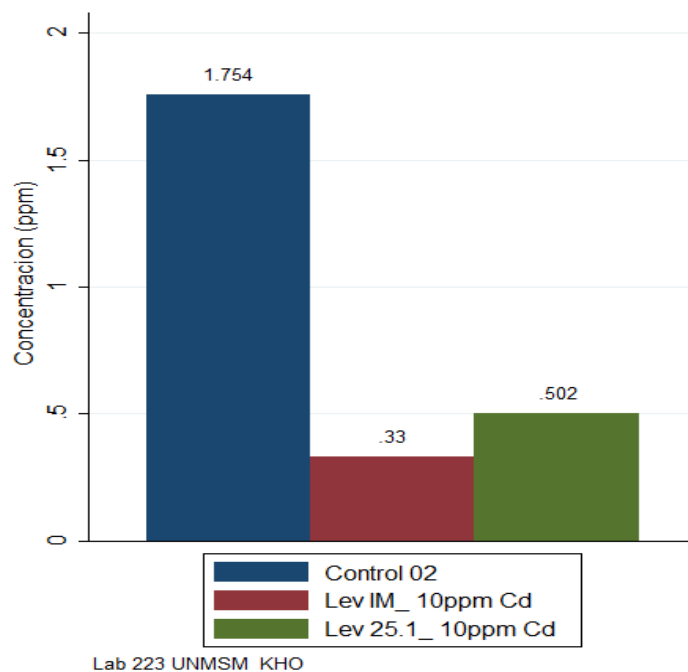


Figura 35: Acumulación de Cd^{+2} en tallo. Las plantas del control 02 acumularon en promedio 1,754ppm, las plantas inoculadas con las levaduras IM y 25,1 acumularon en promedio 0,33 ppm y 0,502 ppm de Cd^{+2} respectivamente, esto evidencia la acción de las levaduras evitando la acumulación de Cd^{+2} en tallos.

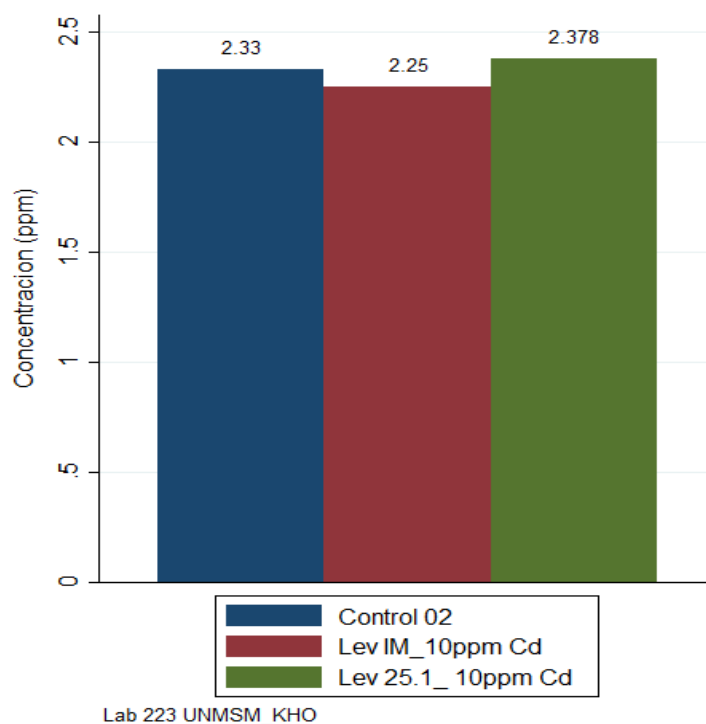


Figura 36: Acumulación de Cd^{+2} en raíz. Las plantas del control 02 acumularon en promedio 2,33 ppm de Cd en raíces, las inoculadas con levaduras IM y 25.1 acumularon 2,25 ppm y 2,378 ppm de Cd respectivamente.

5.10.2 Determinación de la biosorción de Cd por levaduras.

Para determinar la biosorción por levaduras se hizo la resta al valor de la concentración total de Cd^{+2} obtenido de las plantas del control_02 que fue de 4,08 ppm, con los valores obtenidos luego de realizar los tratamientos con las levaduras IM y 25.1 que fueron de 2,59 ppm y 2,88 ppm respectivamente. Obteniéndose tal como se muestra la Tabla 6, un valor de 1,49 ppm para las plantas que fueron tratadas con la levadura IM y un valor de 1,20 ppm para las plantas que fueron tratadas con la levadura 25.1.

Los resultados obtenidos señalan que las cepas de levaduras IM y 25.1 evitan la acumulación de Cd^{+2} en plantas en porcentajes de 36,45% (1,49 ppm) y 29,39 % (1,20 ppm) respectivamente con respecto a las plantas del control 2 (4,08) que representan el 100% de absorción de Cd^{+2} . Ver Figuras 37 y 38.

Tabla 6. Determinación de la eficiencia de biosorción de Cd por levaduras

CODIGO	Cd Total Absorbido por plantas (ppm)	Biosorción de Cd por levaduras (ppm)	Porcentaje de biosorción (%) de Cd por plantas	Porcentaje de biosorción (%) de Cd por levaduras
Control 1	0	0	0%	0
Control 2	4,08	-	100%	-
Lev IM	2,59	1,49	63,55%	36,45%
Lev 25.1	2,88	1,20	70,61%	29,39%

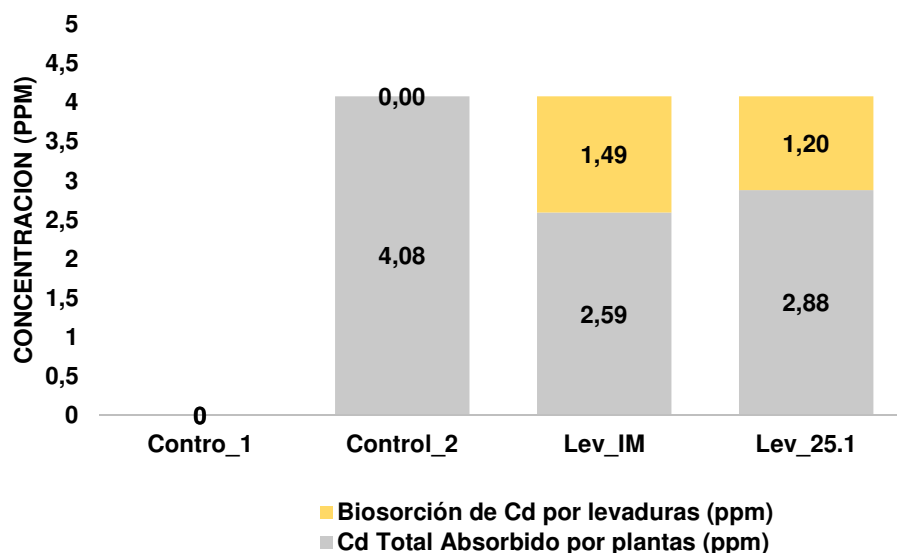


Figura 37: Se puede notar que las plantas tratadas con las levaduras IM y 25.1 evitan la acumulación de 1.49 ppm y 1.20 respectivamente con respecto al control_1 (plantas únicamente en s.h) y el control_2.

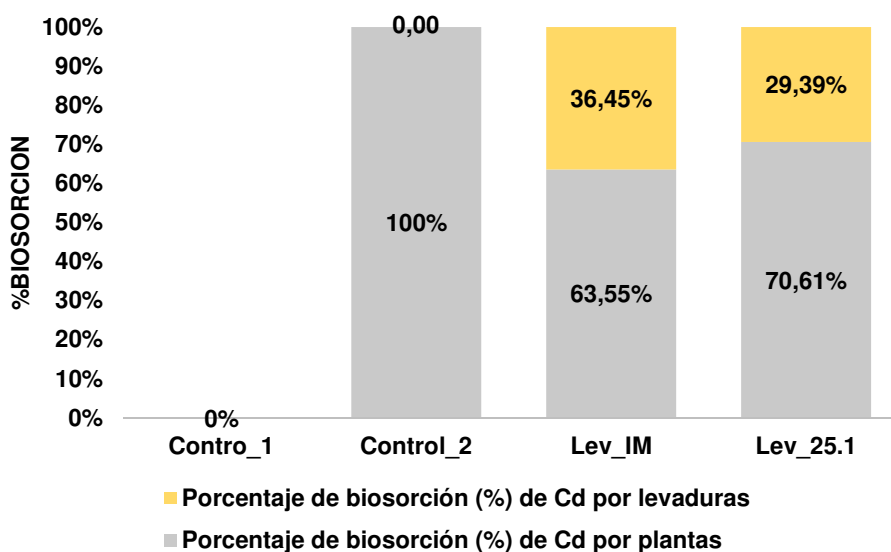


Figura 38: Porcentaje de biosorción por levaduras.- Se puede notar que las plantas tratadas con las levaduras IM y 25.1 evitan la acumulación de Cd en 36,45% y 29,39% respectivamente con respecto al control_1 (plantas únicamente en s.h) y el control_2 (plantas con 10 ppm de Cd)

5.11 Efectos del ion Cd^{+2} y de las levaduras sobre el crecimiento de plantas de tomate.

En las Figuras 39 y 40 se observan los resultados obtenidos de las mediciones del tallo y raíces de las plantas de tomate. Dichas figuras fueron confeccionadas con el software StataMP ver. 14 luego de realizar el análisis estadístico de las medias calculadas con las mediciones (cm) de los tallos y raíces de las plantas de tomate. (Ver Anexo B)

En la Figura 39 se puede observar los resultados de la media de las plantas del control 1 (barra azul) y las plantas inoculadas con las cepas de levaduras IM (barra roja) y la levadura 25.1 (barra verde). Se puede observar que hubo un incremento significativo en el crecimiento del tallo de las plantas en donde fueron inoculadas las levaduras; es decir, la media de las plantas del control 1 (plantas cultivadas únicamente con solución hidropónica) fue de 87,2 cm (100% crecimiento), mientras que las medias de las plantas en donde fueron inoculadas las levaduras IM y 25.1 fue de 114,2 cm y 104,2 cm incrementándose 31,0% y 19.5% respectivamente, siendo estos últimos con un mayor crecimiento. Ver Tablas 7 y 8

De igual manera en la misma Figura 39 (parte derecha) se puede apreciar las medias de los tallos de las plantas que fueron sometidas a una concentración de 10 ppm (control 2) y las plantas que fueron tratadas con las levaduras con la presencia de 10 ppm de Cd en la solución hidropónica (s.h.). La media del control_2 fue de 73 cm (83,7%), la media de las plantas que fueron tratadas con la cepa IM y 25.1 fue de 108.4 cm (24%) y 100.6 cm (15,4%) respectivamente. Estos resultados indican que aun en presencia de 10 ppm de Cd en la solución hidropónica; es decir, hubo un mayor crecimiento de las plantas tratadas con las cepas IM y 25.1 con respecto al control 02. Por otra parte se puede observar que las plantas que no fueron contaminadas con Cd (control 1) tuvieron un mayor crecimiento con respecto a las plantas que fueron sometidas a dicho metal (control 2) con respecto a sus medias.

En la Figura 40 se puede observar que las medias de las raíces del control 1 (barra azul) y control 2 (barra naranja) fue de 54,4 cm (100%) y 45,8 cm (84,2%) respectivamente, indicando que la presencia de metal en las plantas del control 2 influyo en el crecimiento debido a que este es menor al de las plantas del control 1.

De igual manera para las plantas en donde fueron inoculadas las cepas de levaduras IM (barra verde) y 25.1 (barra naranja) las medias fueron de 62,6cm (15,1%) y 56 cm (2,9%) respectivamente, mientras que en las plantas que fueron sometidas a 10ppm de Cd y en donde también fueron inoculadas las levaduras IM y 25.1 las medias fueron de 60,8 cm (11,8%) y 52,4 cm (3,7%) respectivamente.

Estos resultados indican, según el procesamiento estadístico (ver Anexo B) en el cual se observó que hubo una relación significativa en el crecimiento de las plantas inoculadas con levaduras con respecto a las plantas del control 1 (plantas con solución hidropónica) y las plantas del control 2 (plantas con solución hidropónica + 10 ppm de Cd^{+2}).

Por otra parte se notaron también los efectos tóxicos del Cd, debido a que las plantas que no estaban inoculadas con levadura (plantas del control 2) se observó la presencia de marchites, necrosis, clorosis en las hojas; esto no se observó en las plantas del control 1 (sin Cd) ni en las demás plantas tratadas con inóculos de levaduras IM y 25.1 respectivamente y que tuvieron Cd en la solución hidropónica. Evidenciando que las levaduras estarían captando el metal Cd^{+2} de la solución hidropónica, evitando que sea acumulada en exceso en las partes de la planta. Ver imágenes en el Anexo D

Tabla 7. Porcentaje (%) de crecimiento de los tallos de las plantas de tomate

CODIGO		Tamaño de tallos en cm						% CRECIMIENTO
MUESTRA		P1	P2	P3	P4	P5	PROM	
PLANTAS SOLAS	Control1	88	86	88	87	87	87.2	100
PLANTAS + 10ppm Cd	Control 2	75	74	71	73	72	73	83,7%
INOCULO DE LEVADURA	IM	115	114	115	114	113	114.2	31,0%
	25.1	103	104	103	105	106	104.2	19,5%
LEVADURA + 10 ppm Cd	IM	105	108	110	110	109	108.4	24,3%
	25.1	100	101	102	100	100	100.6	15,4%

Leyenda: planta (P)

Tabla 8. Porcentaje (%) de crecimiento de las raíces de las plantas de tomate

CODIGO		Tamaño de raíces en cm						% CRECIMIENTO
MUESTRA		R1	R2	R3	R4	R5	PROM	
PLANTAS SOLAS	Control1	54	56	55	53	54	54.4	100%
PLANTAS + 10 ppm Cd	control 2	45	47	44	46	47	45.8	84,2%
INOCULO DE LEVADURA	IM	63	62	64	63	61	62.6	15,1%
	25.1	55	56	58	56	55	56	2,9%
LEVADURA + 10 ppm Cd	IM	61	62	61	60	60	60.8	11,8%
	25.1	52	52	53	54	51	52.4	3,7%

Leyenda: Raíz (R)

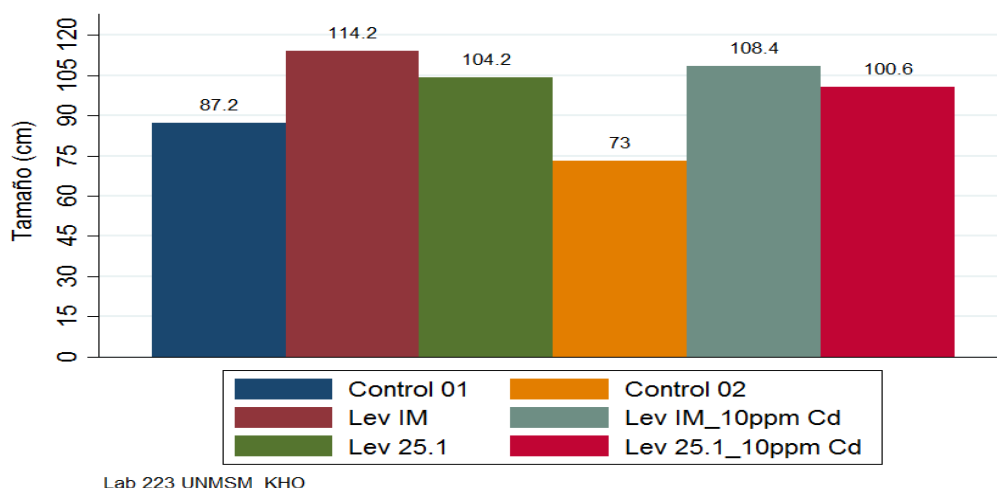


Figura 39: Medias del crecimiento de los tallos (cm). En la figura se puede observar que las plantas tratadas con inóculos de levaduras IM y 25.1 tuvieron un mayor crecimiento con respecto al control 01. De igual manera en aquellas plantas que fueron sometidas a 10 ppm de Cd, el crecimiento aumentó con respecto a las plantas del control 02. Evidenciando el efecto de las levaduras en el crecimiento.

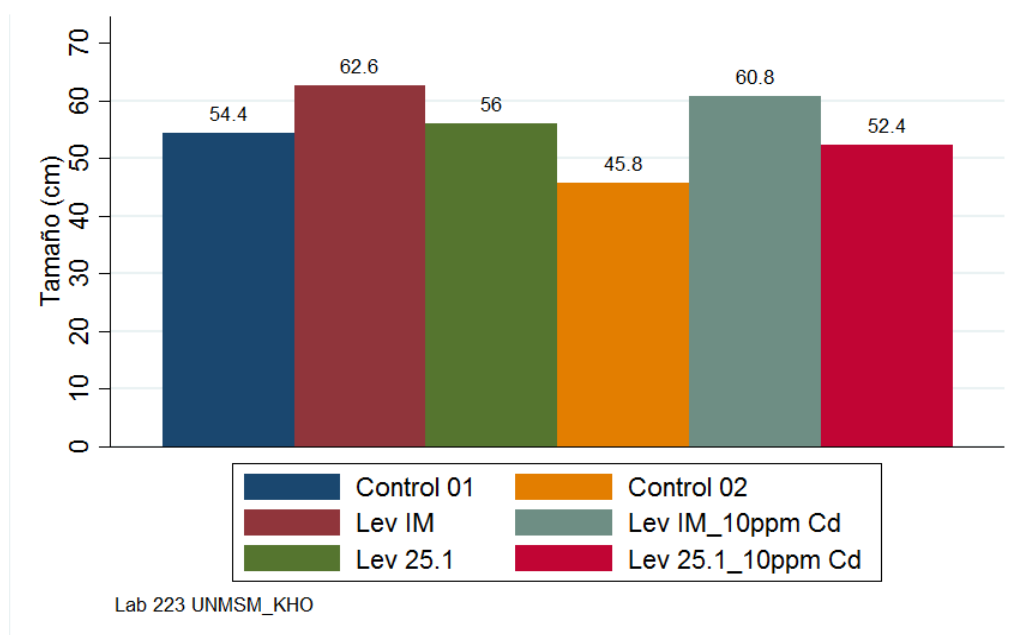


Figura 40: Medias del crecimiento de las raíces (cm). En la figura se puede observar que las plantas tratadas con inóculos de levaduras IM y 25.1 tuvieron un mayor crecimiento en sus raíces con respecto al control 01. De igual manera en aquellas plantas que fueron sometidas a 10 ppm de Cd, el crecimiento de las raíces aumentó con respecto a las plantas del control 02. Evidenciando el efecto de las levaduras en el crecimiento.

5.12 Identificación molecular de levaduras

Los amplicones de la PCR se visualizan en la Figura 41, estos fueron secuenciados por Molecular Cloning Laboratories (McLab) USA, California y ensamblados con el programa CAP3. Se utilizó el programa BlastN para comparar las secuencias de la región D1/D2 LSU con otras levaduras identificadas y suscritas en el Genbank, los resultados se muestran en el Anexo A.

De acuerdo al análisis molecular, las cepas 25.1 y IM fueron identificadas como *Yarrowia lipolytica*; la cepa 11.10.A fue identificada como *Pichia guilliermondii*; en tanto las cepas 11.10.X y 17.1.2 fueron identificadas como *Rhodothorula toluroides* y *Rhodothorula mucilaginosa*, respectivamente.

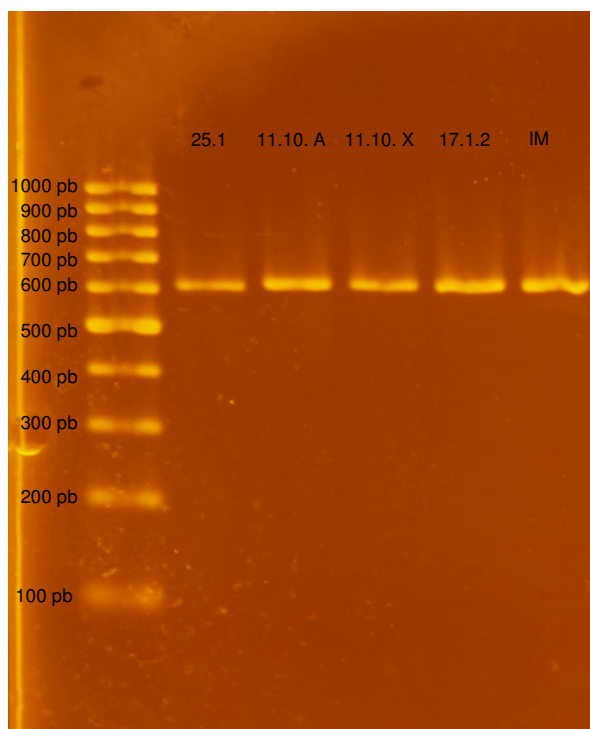


Figura 41: Amplicones (600 pb aproximadamente) en gel de agarosa al 2% de la región D1/D2 LSU, de 05 levaduras Altoandinas: Marcador utilizado 100 pb DNA ladder ThermoFisher SCIENTIFIC.

6 DISCUSIÓN

6.1 Resistencia de levaduras a Cd⁺²

Las cepa 25.1 y la cepa IM identificadas como *Yarrowia lipolytica* presentaron la mayor resistencia a todas las concentraciones de Cd estudiadas, de igual manera la cepa 11.10.A identificada como *Picchia guilliermondi* presento alta tolerancia a todas las concentraciones estudiadas. Por otra parte las cepas 11.10.X y 17.1.2 identificadas como *Rodothorula toluroides* y *Rodothorula mucilaginosa* respectivamente, toleran las diferentes concentraciones de Cd presentes en el medio de cultivo, debido a su rápido crecimiento. Zhijian *et al.*, (2008) estudiaron algunos aspectos de las respuestas celulares al cadmio en la levadura *Rhodotorula sp. Y11*, mediante microscopía electrónica de barrido indicando que la acumulación de cadmio en la levadura no causaba ningún efecto visible sobre la morfología celular, además reportaron que el 20% de células de levadura todavía mostraron viabilidad después de 15 h de acumulación de cadmio por debajo de 100 ppm de concentración, y el análisis por microscopía electrónica de transmisión mostró que no se observaron modificaciones celulares externas. Por otro lado, Tohoyama *et al.*, (1977) aislaron y caracterizaron una cepa de levadura (no identificada) resistente a 3 ppm de Cd⁺² y determinaron que la resistencia a dicho metal depende de la concentración del metal, del inóculo celular y de la estructura fisicoquímica de la levadura, planteando la posibilidad de emplear dicha levadura en procesos de remoción de Cd⁺² de aguas residuales.

Según lo reportado por Serero *et al.*, (2008), estudiaron la cepa *Saccharomyces cerevisiae* e identificaron 73 genes, cuya inactivación confiere una mayor sensibilidad al metal Cd⁺². El análisis del fenotipo sensible reveló que 17 genes (Entre ellos se menciona a los genes RAD27 y DNA2 que codifican proteínas implicadas en la reparación y replicación del ADN) se encuentran específicamente involucrados en la respuesta inducida por cadmio.

6.2 Determinación de la Concentración Letal Media (CL50)

Se llevaron a cabo los experimentos para determinar las concentraciones de Cd^{+2} que inhiben el 50 % del crecimiento de las levaduras estudiadas. Los resultados indican que una concentración de 70 ppm del ion Cd^{+2} , reduce en 51,2; 50.9 y 52.1% la población de las cepas identificadas como *Yarrowia lipolytica* (IM; 25.1) y *Picchia guilliermondi* (11.10.A) respectivamente a un pH 6,0, indicando que mayores concentraciones de este metal resultan tóxicos para dichas levaduras.

Por otra parte, en el caso de la cepa 11.10.X (*Rhodotorula mucilaginosa*) una concentración de 60 ppm reduce el 50% de la población inicial, indicando que esta cepa es sensible a mayores concentraciones de Cd^{+2} , de manera análoga la cepa 17.1.2 (*Rhodotorula toruloides*) fue la que presentó mayor sensibilidad al metal Cd^{+2} debido a que una concentración de 20 ppm de Cd^{+2} disminuyó su población inicial en 47.2%. Estos resultados son mayores a los reportados por Muñoz *et al.*, (2012) quienes determinaron que la concentración letal media (CL_{50}) para *Rhodotorula mucilaginosa* se encontraba entre 15 y 17 ppm de Cd^{+2} , por tanto las cepas estudiadas en la presente investigación toleran mejor altas concentraciones de Cd^{+2} , presentándose como candidatos en futuras aplicaciones biotecnológicas de recuperación y/o remoción de Cd^{+2} de ambientes contaminados.

En nuestra búsqueda y revisión en diversas bases de información bibliográfica, no se encontraron estudios de CL_{50} con cepas de *Yarrowia lipolytica* y *Picchia guilliermondi*; sin embargo, se reportan diversos ensayos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tal es caso de Soares *et al.*, (2003), reportaron que el ion cobre (Cu^{+3}) 200 μM indujo una disminución en aproximadamente un 50% en el número de células viables en los primeros 5 minutos de exposición y en 4 horas para el plomo (Pb^{+2}), mientras que el níquel (Ni^{+3}) no fue tóxico hasta una concentración de 200 μM en un período de 48 h a pH 6,0 de la solución. Por tanto, la presente investigación vendría a ser el primer reporte para el ensayo de CL_{50} con las cepas de *Yarrowia lipolytica* y a concentraciones de Cd^{+2} más altas.

6.3 Biosorción de Cd^{+2} en levaduras

Según lo reportado por Miranda (2013), la levadura *Saccharomices cerevisiae* a una concentración inicial de 80 ppm de Cd, remueve el 37.6% de Cd del medio a las 6 horas de ensayo. A su vez Imandi *et al.*, (2013) reportaron que la levadura marina *Yarrowia lipolytica* (biomasa viva) a un pH 6,0 remueve un valor máximo de 48.89% de una concentración inicial de 50 ppm de Cd^{+2} del medio.

Rehman *et al.*, (2011) estudiaron la capacidad de biosorción de Cd^{+2} por una cepa de *Candida tropicalis* cultivada en un medio que contenía inicialmente 100 ppm de Cd^{2+} , *C. tropicalis* podría disminuir Cd^{+2} en un 70, 85 y 92% del medio después de 48, 96 y 144 horas respectivamente. De manera análoga, en la presente investigación, las cepas IM y 25.1 identificadas como *Yarrowia lipolytica* removieron un máximo de 62,4 y 52,0% del ion Cd^{+2} a las 60 horas, en una concentración inicial de 40 ppm de Cd^{+2} en el medio a un pH 6,0, representado un alto porcentaje de remoción del metal para las cepas estudiadas, cercanas con lo reportado por Rehman *et al.*, (2011).

6.4 Evaluación de la eficiencia de biosorción en cultivo hidropónico de tomate

Se observó que las levaduras empleadas con el objetivo de evitar la bioacumulación de Cd^{+2} en plantas de tomate resultaron ser eficientes en la remoción de metal Cd^{+2} de la solución hidropónica.

Se determinó que la cepa IM retuvo 36,45% (1,49 ppm) del total de Cd presente en las plantas del control_2 (4,08ppm), resultado ser el mayor porcentaje de retención en comparación con la cepa 25.1 que retuvo un total de 29,39% (1,20 ppm) del ion Cd^{+2} con respecto al control_2 durante los 20 días de ensayo. Dichos resultados son similares a los determinados por Valdiviezo *et al.*, (2002), quienes estudiaron la acumulación y los efectos de Cadmio y Níquel en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a los 56 días después de trasplantados para lo cual suministraron niveles crecientes (0,3 ppm hasta 6 ppm) de Cd^{+2} en las soluciones hidropónicas.

Posteriormente realizaron la medición de Cd en tejidos, para lo cual dividieron cada planta en 3 porciones correspondientes a raíz, tallo y frutos, encontrando que hay una mayor acumulación de Cd en las raíces con cerca al 80 % (4,8 ppm) y el 20% (1,2 ppm) en hojas y frutos, en proporciones ligeramente decrecientes como los reportados por Chan & Hale (2004). De acuerdo con dichos resultados, se puede afirmar que la acumulación y detección de niveles de Cd^{+2} depende en gran medida del tiempo de contacto, siendo mayor la acumulación en plantas con prolongado contacto a dicho metal.

6.5 Efectos tóxicos del Cadmio en plantas de tomate

Por otra parte también se evaluaron de manera cualitativa los efectos adversos que causa el Cd^{+2} en plantas de tomate. Según lo reportado por DalCorso *et al.*, (2010) la absorción del ion Cd^{+2} por raíces y la distribución a los órganos vegetativos y reproductivos tiene un efecto negativo en la nutrición mineral en consecuencia en el desarrollo normal de la planta. Aún no se conocen los mecanismos del transporte y de la toxicidad de Cd en las plantas, según lo describe Sandalio *et al.*, (2001), el ion Cd^{+2} interfiere en la entrada, transporte y aprovechamiento de los principales elementos esenciales como Ca, Mg, P y K.

Benavides *et al.*, (2005), mencionan que uno de los principales efectos de la toxicidad del Cd en plantas es la presencia de clorosis como consecuencia de una deficiencia de hierro, fosfatos y/o manganeso, a su vez, el Cd reduce la fijación de CO_2 en las plantas ocasionando desequilibrios en el metabolismo del cloroplasto debido a que inhibe la síntesis de clorofila obstruyendo el desarrollo normal de la fotosíntesis. Dichos reportes son similares a los observados en el presente estudio, debido a que se evidenció la clorosis en las hojas de la mayoría de las plantas expuestas al ion Cd^{+2} (control 2), también se observó marchites, necrosis en las hojas y un decaimiento general en plantas acompañado de debilidad en las nervaduras centrales (tallos) como consecuencias de los efectos tóxicos del ion Cd^{+2} pese a que en la literatura se

reporta al tomate como a una de las plantas que tolera niveles altos de metales pesados según Valdiviezo *et al.*, (2002).

Por otra parte en las plantas que no se evidenciaron dichos efectos tóxicos Thomine *et al.*, (2000), reportan que existen mecanismos de tolerancia a metales pesados por parte de las plantas, mencionan a la raíz como una de las principales defensas frente al ingreso de metales pesados a la planta, mediante las pectinas de la pared celular radicular, los carbohidratos extracelulares como el mucílago y calosa de la raíz que ayudan en la retención del ion Cd^{+2} , en tal sentido se puede contrastar dicha afirmación debido a que en los resultados obtenidos en la presente investigación se determinó que las raíces acumularon un gran porcentaje del ion Cd^{+2} presente en el cultivo hidropónico (ver Tabla 4) y esto mismo fue reportado por Cobb *et al.*, (2000), quienes al estudiar la concentración de metales pesados en tomate, lechuga, rábano y frijol señalan que la raíz concentra mayor cantidad de metales pesados y en proporciones decrecientes en frutos y demás partes.

De igual manera Salt *et al.*, (1995) señalan que la acumulación de Cd en los tricomas de la superficie foliar es un mecanismo de inmovilización de Cd en las planta. Por su parte Hamer *et al.*, (1986) señala a las fitoquelatinas como una de las principales moléculas que las plantas sintetizan como defensa frente al ingreso de metales pesados en el interior, también mencionan a otras moléculas como los ácidos orgánicos, aminoácidos, metalotioneinas que ayudan al secuestro y posterior almacenamiento en vacuolas evitando la toxicidad de los metales.

Estos reportes son similares a los resultados obtenidos en la presente investigación, debido a que las plantas de tomate sometidas a 10 ppm del ion Cd^{+2} y tratadas con levaduras tuvieron una mejor tolerancia al metal.

6.6 Efectos de las levaduras en el crecimiento de las plantas de tomate

Recientemente se están reportando el potencial de diversas especies de levaduras para promover el crecimiento de plantas mediante diferentes mecanismos como la producción de compuestos como ácido indol-3-acético y otros ácidos orgánicos, así como de giberelinas, putrescina y cadaverina que se han vinculado con la capacidad de incrementar el contenido de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y minerales en diversos cultivos de interés comercial (Bashan *et al.*, 2004).

Tal es así que Betolla *et al.*, (2015) realizaron ensayos para evaluar el efecto de la irrigación con las levaduras *Debaryomyces hansenii* var. *Fabry*, *Yarrowia lipolytica* YIBCS002, *Yarrowia lipolytica* var. *BCS* y *Candida pseudointermedia* sobre el contenido nutricional final del forraje verde hidropónico de maíz (*Zea mays* L.). Concluyendo que la adición de levaduras del género *Debaryomyces*, *Candida* y *Yarrowia* en la solución de riego de sistemas hidropónicos mejora el contenido de nutrientes del forraje verde de un 16% a un 19% con respecto a los forrajes cultivados únicamente con solución hidropónica.

Por su parte, Amprayn *et al.*, (2012), investigaron la capacidad de la levadura *Candida tropicalis* YH para estimular el crecimiento de las plántulas de arroz, reportaron que dicha levadura produjo pequeñas cantidades de ácido indol-acético (AIA) un tipo de fitohormona esencial para el crecimiento de las plantas. A su vez reportaron que al inocular una concentración aproximada de 10^6 ufc/ml, dichas levaduras colonizaron rápidamente las raíces en 3 días estimulando su crecimiento con el aumento en el peso seco de las raíces de un 16 a 35 % en comparación con las plántulas no inoculadas con la cepa *C. tropicalis*.

En la presente investigación también se evidenció que las levaduras ayudaron en el crecimiento de las plantas. Las mediciones que se realizaron en la parte superior de las plantas (tallos) y raíces, notándose que existe una relación estadísticamente significativa entre el crecimiento de tallos y raíces con la adición de inóculos de levaduras. Es decir, que en aquellas plantas en donde fueron inoculadas una

concentración de 10^6 ufc/ml similar al usado por Amprayn *et al.*, 2012 de las levaduras IM y 25.1, lograron incrementar su tamaño en 31.0% y 19.5% en tallos y en 15.1% y 2.9% en raíces respectivamente con respecto a las plantas que fueron cultivadas únicamente en solución hidropónica. También se determinó que dichas levaduras estimularon el crecimiento de los tallos y raíces en aquellas plantas que fueron sometidas a una concentración de 10 ppm del metal Cd en 24 % y 15% para tallos y en 11.8% y 3.7% para raíces respectivamente. Siendo estos valores similares a los reportados por Amprayn *et al.* 2012.

6.7 Identificación molecular

Para la identificación de cepas ambientales como es caso de las cepas usadas en el presente trabajo se hizo necesaria la aplicación de técnicas moleculares recientes y modificaciones de kits comerciales debido a que muchas de las cepas son raras y muy poco estudiadas tal como lo reportó Orbegozo *et al.*, (2008). Torres M., (2015) identificó tres cepas de levaduras resistentes a cobre usando la región D1/D2 del RNAr 28s obtuvo un 94% de identidad con respecto a la base de datos del GeneBank/ENA/DDBJ con la levadura *Yarrowia lipolytica*. En nuestro estudio se usó la misma región D1/D2 del RNAr 28s pero con los iniciadores FR3 y LR3 descritos anteriormente, que al ser amplificados y secuenciados las cepas IM y 25.1 tuvieron un 98% de similitud con la cepa *Yarrowia lipolytica*.

Estos resultados demuestran el potencial que tienen las levaduras tanto en el campo de la biorremediación de metales pesados y en el campo agrícola ya que pueden ser aplicadas como bioestimulantes o promotores de crecimiento vegetal, reemplazando a los fertilizantes y agroquímicos.

7 CONCLUSIONES

- La levadura *Yarrowia lipolytica* (Cepas IM, 25.1) retiene entre el 29.9% y 36.5% de Cd^{+2} de la solución hidropónica evitando la excesiva bioacumulación en plantas de tomate.
- La levadura *Picchia guilliermondi* (11.10.A) remueve 51,47 % de Cd^{+2} *in vitro* y puede ser usada en hidroponía.
- Existen diferencias significativas en el crecimiento de tallos y raíces entre las plantas cultivadas únicamente en solución hidropónica con aquellas plantas que fueron inoculadas con levaduras.
- La raíz acumula en mayor medida el Cd^{+2} a diferencia de los tallos.
- La levadura *Yarrowia lipolytica* (cepas IM y 25.1) estimula el crecimiento de las plantas de tomate incluyendo a las que estuvieron expuestas a 10 ppm de Cd
- Las levaduras estudiadas en la presente investigación presentan capacidades para ser usadas como promotoras (bioestimulantes) de crecimiento en plantas.

8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda repetir los ensayos en hidroponía con la cepa *Picchia guillermonti* (11.10.A) por presentar un alto porcentaje de remoción de Cd^{+2} *in vitro* en los ensayos de biosorción.
- En los ensayos en hidroponía se recomienda realizar una correcta aireación y tener en cuenta la cantidad de oxígeno disuelto a suministrar, para ello se recomienda ajustar la aireación con un flujometro en un rango de 0.5 L/min. Y emplear difusores de plástico y limpiar correctamente cada 3 días para evitar el crecimiento de biopelículas microbianas y genere obstrucción.
- Se recomienda usar bandejas con mayor profundidad a fin de asegurar que las raíces de las plantas crezcan de manera vertical y así evitar que se enreden con las plantas contiguas. Así mismo se recomienda poner un máximo de 4 plantas en cada bandeja para evitar sobrecarga en las bandejas y asegurar un mejor manejo de las mismas.
- Se recomienda usar las cepas del género *Rodothorula* en ensayos de resistencia y biosorción frente a otros metales pesados debido a que se están reportando que presentan capacidades de ser usadas en biorremediación de metales pesados por su alta tolerancia y adaptación a ambientes extremos.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **Agrodata Peru.** Exportación de tomate en Perú. MINAGRI (2015). Disponible en: <https://www.agrodataperu.com/exportaciones>
- **Avery, S.V.** & Tobin, J.M. Mechanism of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* (1992) vol. 58, pp. 3883–3889.
- **Ballardo, C.** Evaluación de la capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) y Plomo (II) mediante el uso de biomasa bacteriana muerta en soluciones acuosas. Artículos Originales, Facultad de Ciencias Biológicas. (2015) Rev. Per. Biol. Vol. 2. N° 2.
- **Bashan Y,** Holguin G, Bashan LE. Azospirillum-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). (2004) Can J Microbiol 58, pp 23.
- **Bashar H., et al.** Kinetics and Equilibrium of Cadmium Biosorption by Yeast Cells *S. cerevisiae* and *K. fragilis*. (2003). Can J Microbiol 60, pp 13.
- **Beltrán, M.** Biorremediación de metales pesados cadmio (cd), cromo (cr) y mercurio (hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. (2016) Rev. Universidad militar Nueva Granada. Vol. 12. N 2
- **Buffle, J.,** Scott Altmann, R. Interpretation of Metal Complexation by heterogeneous Complexants en Aquatic Surface Chemistry: Chemical Processes at the Particle - Water Interface. (1987)
- **Cala, V.,** J. Rodríguez, S. y Guerra, A. Contaminación de metales pesados en suelos de la Vega de Aranjuez. (I) Pb, Cd, Cu, Zn, Ni y Cr. (1985) Anal. Edaf. Agrobiol. 32: 1595-1608.
- **Capó M.A.,** Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. 1era Ed. Editorial Tebar. (2007)
- **Casamorin JA,** Bennett R, & Dedeles G. Biosorption of Cd (II) by Yeasts from Ripe Fruit Peels in the Philippines. (2014) Journal of Health and Pollution: Vol. 4, No. 7, pp. 14-24.
- **Centro de Innovación Tecnológica del Cacao.** (CITE CACAO - USAID PDA). Estudio “Contenido de Cadmio y Plomo en la Producción de Cacao en San Martín”. (2011). Consultores: Huamani, H y Huauya, M. Tarapoto, San Martin, Perú.
- **Chan, D.Y.,** Hale, B.A. Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. (2004) Journal of Experimental Botany vol. 55, pp. 2571-2579.
- **COBB, G. P.;** K. SANDS; M. WATERS; B. G. WIXSON; E. DORWARD-KING. ACCUMULATION OF HEAVY METALS BY VEGETABLES GROWN IN MINE WASTES. (2000). Environmental Toxicology and Chemistry vol. 19(3), pp. 600-607.
- **Dahiya, S.,** Karpe, R., Hegde, A., Sharma, R., Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. J. Food Compos. (2005). Anal. Vol. 18, pp. 517–522.
- **FAO.** Manual de Cultivos Hidropónicos (2003)
- **Fergusson, JE.** The heavy elements: Chemistry environment impact and health effects. (1990) Pergamon Press. London, UK.
- **Geoffrey PL,** James MC. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis (1999). Current Opinion in Biotechnology, Vol. 10, N 5, pp. 422-427, ISSN 0958-1669. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00004-X).
- **Göksungur, Y.,** Üren, S. & Güvenç, U. Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass. (2005) *Biores Technol* vol. 96, pp. 103–109.

- **Goldani LZ**, Craven DE, Sugar AM. Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in a patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole. (1995) J Med & Vet Mycol. Vol. 33, pp. 267- 70.
- **Greenwood NN.**, Earnshaw A. Biosorption of heavy metals. Chemistry of the Elements 2nd ed. (2002) Elsevier Science.
- **Gutiérrez, S.** Estudio de la Bioadsorción de cadmio y plomo con biomasa de *Serratia marcescens* M8A-2T, a nivel de laboratorio. (2015) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas.
- **Hamer, D.** Metallothionein. Annual Review of Biochemistry. (1986). Vol. 55. pp. 913-951.
- **Harikrishna, N.**, Narasimhulu, K., STUDIES ON BIOSORPTION OF CADMIUM BY *Pseudomonas putida*. (2012) International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA). Vol. 2, Issue 3, pp. 2217-2219.
- **Hiroshi T**, Murayama T., Isolation and Some Characteristics of Cadmiumresistant Yeast. (1977). Rev. Agric., Bioi. Chem., vol. 41 (8), pp. 1523- 1524.
- **Imandi, S.B.**, Chinthala, R., Saka, S. et al. Korean J. Chem. Eng. Application of Doehlert experimental design for the optimization of cadmium biosorption in an aqueous solution by marine yeast biomass of *Yarrowia lipolytica*. (2013) Disponible en : <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0012-0>
- **Jiménez C.**, Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. (2015). Rev. Scielo. Vol.10, No.1. pp. 89-104
- **Jiménez R**, Guillermo R *Toxicología fundamental*. (2009). Ediciones Díaz de Santos. p. 34.
- **Kabata-Pendias, A.** Agricultural problems related to excessive trace metal contents of soils: Problems and solutions. (2011).
- **Lee, C. C.**, Environmental Engineering Dictionary. (2005). Government Institutes. p. 451.
- **Leeber DA**, Irwin S. *Rhodotorula fungemia* presenting as “Endotoxic shock”. (1969) Arch. Intern. Med.Vol.123, pp. 78-81.
- **Machado D.**, Removal of heavy metals using a brewer’s yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass (2009). J Appl Microbiol. Vol. 106, N 6, pp. 1792-8048.
- **Malik, A.** Management of Microbial Resources in the Environment. (2013) Ed. Springer. 2da Ed.
- **Martínez, G.**, & Palacio, C. Tesis: Determinación de metales pesados cadmio y plomo en suelos y granos de cacao fresco y fermentado mediante espectroscopia de absorción atómica de llama. (2010) Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- **McLaughlin, M.J.**, Singh, B.R. Cadmium in Soils and Plants. (1999) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- **Ministerio del Ambiente (MINAM).** Foro Metales Pesados en América Latina y en el Perú (2017) Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/notas-de-prensa/se-presentaron-valiosas-experiencias-en-gestion-de-salud-y-medio-ambiente-ante-metales-pesados>
- **Miteva, E.**; Maneva, S.; Hristova, D., Bojinova Y., Heavy metal accumulation in virus-infected tomatoes (2001) J. Phytopatol. Vol. 149, pp. 179-184.
- **Moreta, M.** Análisis de la resistencia a estrés por metales pesados de levaduras aisladas del volcán Tungurahua, Ecuador (2016). Universidad Técnica de Ambato.
- **Mounicou, S.**, Szpunar, J., Andrey, D., Blake, C., Lobinski, R., Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. (2003) Food Addit. Contam. Vol. 20, pp. 343–352.
- **Orbegozo, J.** Identificación molecular de *Pichia guilliermondii* aislada de aguas ácidas de minas en el Perú y su resistencia a metales pesados. (2008). Rev Per de Biol. Vol. 15(1) pp. 91-96

- **Ortiz D.F.**, Ruscitti, T., McCue, K.F., Ow, D.W. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. (1995) Journal of Biological Chemistry. Vol. 270, pp. 4721-4728.
- **Prieto M.**, Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. (2009) Tropical and Subtropical Agroecosystems. Vol. 10 pp. 29 – 44
- **Rehman AM**, Sohail MA. Multiple metal tolerance and biosorption of cadmium by *Candida tropicalis* isolated from industrial effluents: glutathione as detoxifying agent. (2011) Environ Monit Assess 174:585–595
- **Repetto J**, Khun G., Toxicología fundamental. (2009) Ediciones Díaz de Santos. p. 34.
- **Ruiz MD.**, Cardona Zorrilla MD. Aislamiento de *Rhodotorula sp.* en un paciente críticamente enfermo. Descripción de un caso y revisión de la literatura. (2001) Revista Médica Infecto Vol. 5, pp. 3-8
- **Salt, D.E.**, Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I. Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. (1995) Plant Physiology. Vol.109, pp. 1427-1433.
- **Serero A**, Lopes J, Nicolas A, Boiteux A. Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity, DNA Repair. (2008) NCBI Vol. 7, N° 8, pp. 1262-1275. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786408001377>
- **Sierra Exportadora**. Programana Nacional de Cacao. (2016). Disponible en: <http://www.sierraexportadora.gob.pe/programas/cacao/que-significa.php>
- **Subir K.**, Nandy RK, Srivastava R,. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. (2018). Microbiological Research, Vol. 207, pp. 83-90. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.013>.
- **Suh, J.H.** and Kim, D.S. Effects of Hg²⁺ and cell conditions on Pb²⁺ accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. (2000) Bioprocess Eng. Vol. 23, pp. 327–329.
- **THERMOFISHER SCIENTIFIC GENET JET DNA** Purification KIT. (2017)
- **Thomine, S.**, Wang, R., Ward, J., Crawford, N., Schroeder, J. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. (2000) Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol. 97, pp. 4991-4996.
- **Vasudevan V.**, Padmavathy, P., Dhingra SC., Kinetics of biosorption of cadmium on Baker's yeast. (2003) Process Biochemistry. Vol. 38, pp. 1389–1395.
- **Volesky, B.** & Vieira, RH,. Biosorption: a solution to pollution. (2000) Rev Int Microbiol vol. 3, pp. 17–24.
- **Volesky, B.** Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. (2001) Rev. Hydrometallurgy. Vol. 59, pp. 203–216.
- **Wang, J.** & Chen, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. (2006) Rev. Biotechnol Vol. 24, pp. 427–451.
- **Yong HJ**, Paul ED, Sandra JMc, Hanan AR, Pierre R. Bushel, Jonathan HF. Global Transcriptome and Deletome Profiles of Yeast Exposed to Transition Metals. (2008) Rev. PLoS Genet. Vol.4, pp. 4
- **Zarcinas, B.**, Ishak, C., McLaughlin, M., Cozens, G., Heavy metals in soils and crops in Southeast Asia. (2004) Rev. Environ. Geochem. Health. Vol. 26, pp. 343–357.
- **Zhang L**, Zhao L, Yu Y, Chen C. Removal of lead from aqueous solution by non-living *Rhizopus nigricans*. (2014) Water Resour. Vol. 32(5). Pp. 1437-44. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii>
- **ZhiJian Li** & HongLi Yuan,. Responses of *Rhodotorula sp.* Y11 to cadmium. (2008) Rev. Biometals vol. 21, pp. 613–621

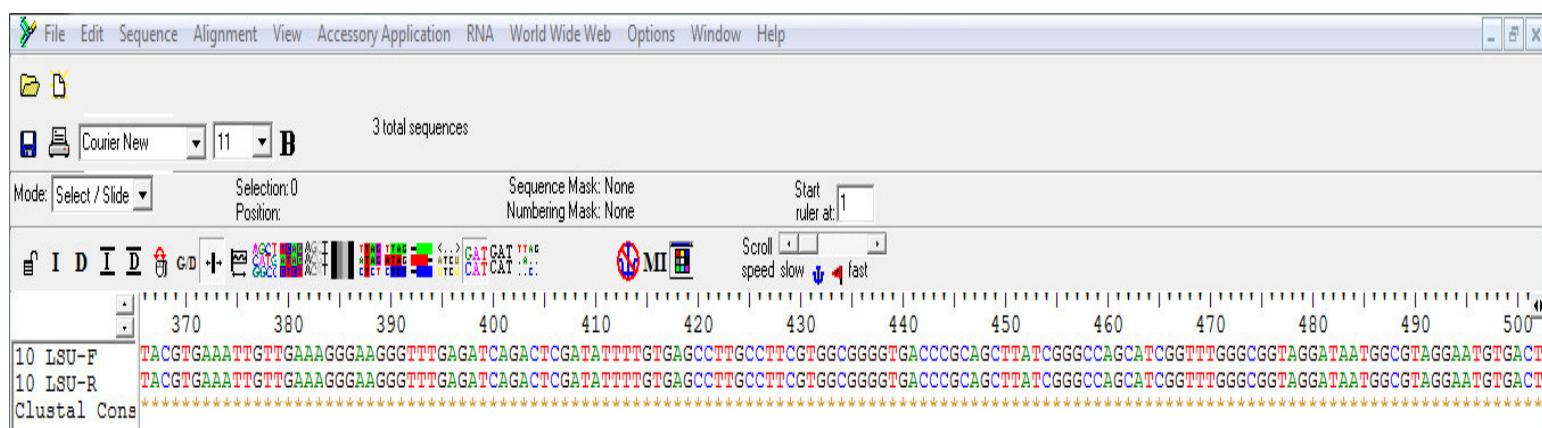
10 ANEXOS

ANEXO A

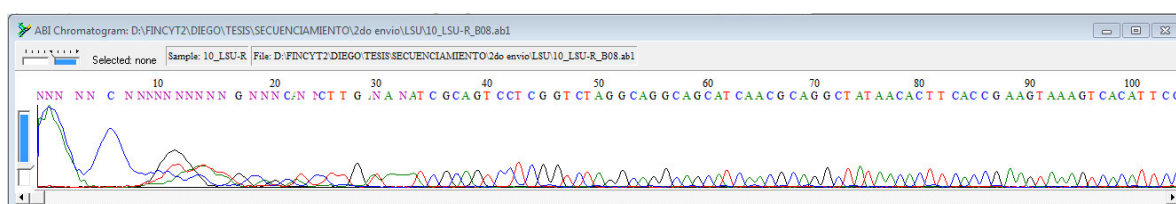
I. Identificación molecular

Los archivos de la secuenciación fueron editados con el SOFTWARE BIOEDIT v7.0.5, luego se asignaron el género y la especie según la comparación con la base de datos del GeneBank

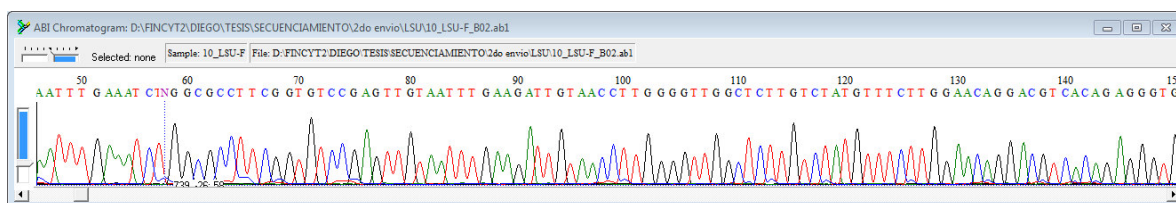
1. CEPA 25.1: *Yarrowia lipolitica*.



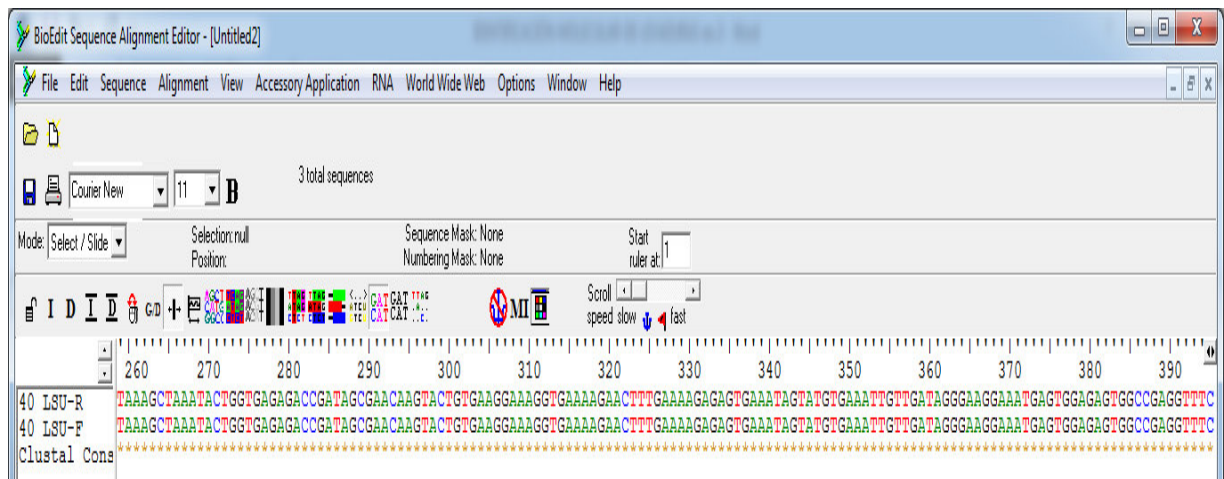
1.1 REVERSE



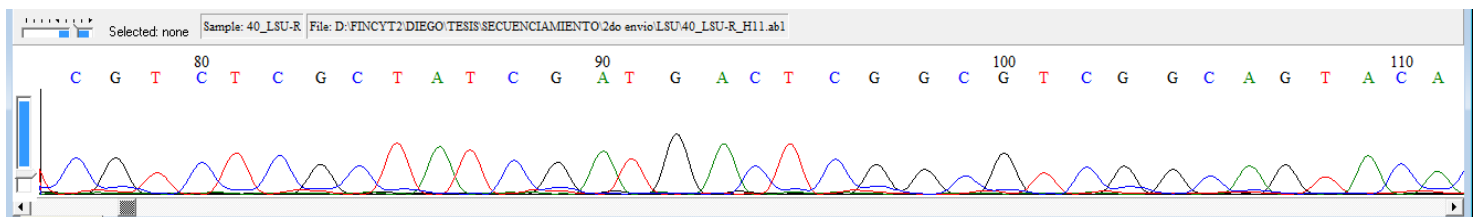
1.2 FORWARD



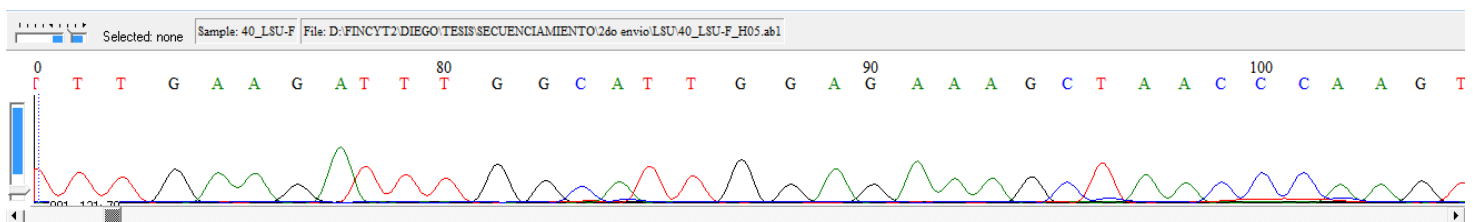
2. CEPA 11.10.A: *Pichia guillermoidii*.



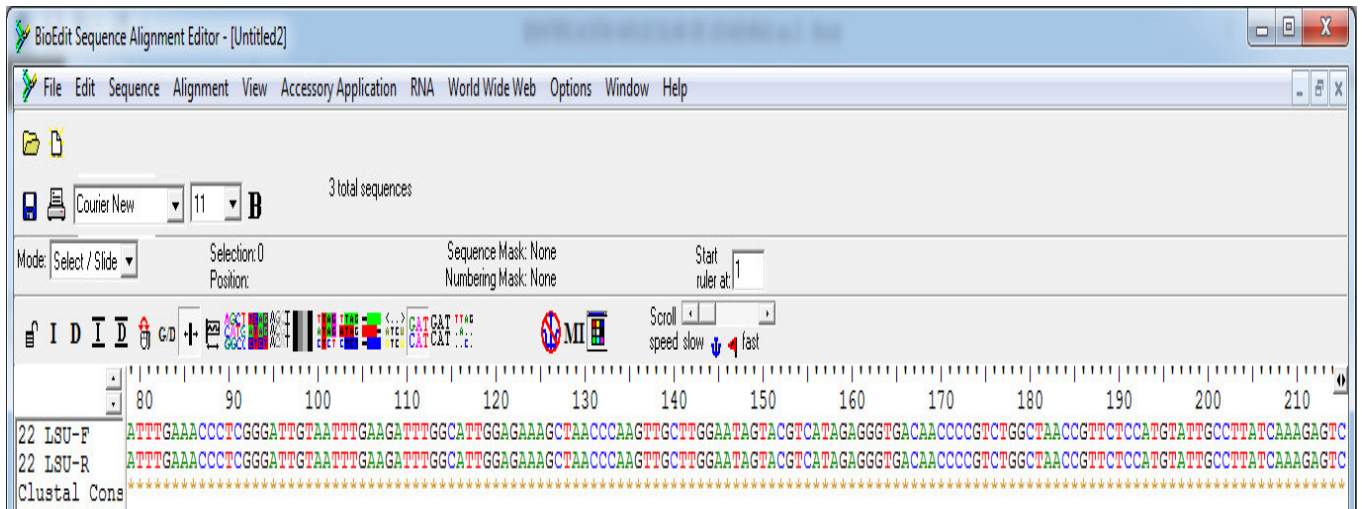
2.1 REVERSE



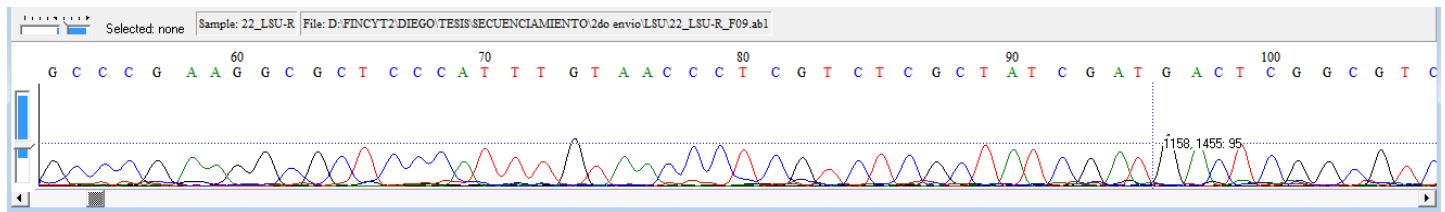
2.2 FORWARD



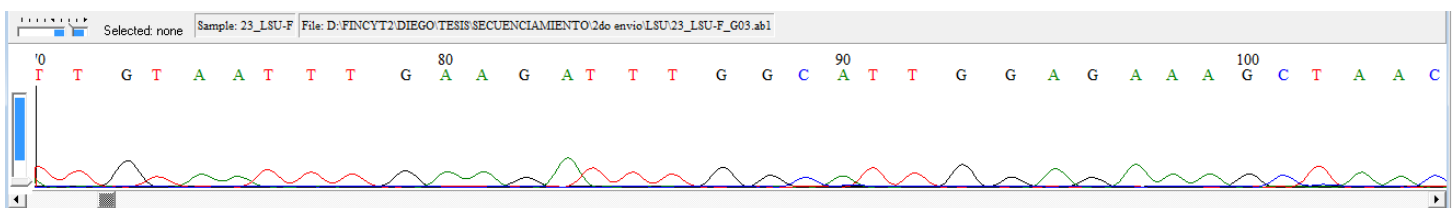
3. IM *Yarrowia lipolytica*



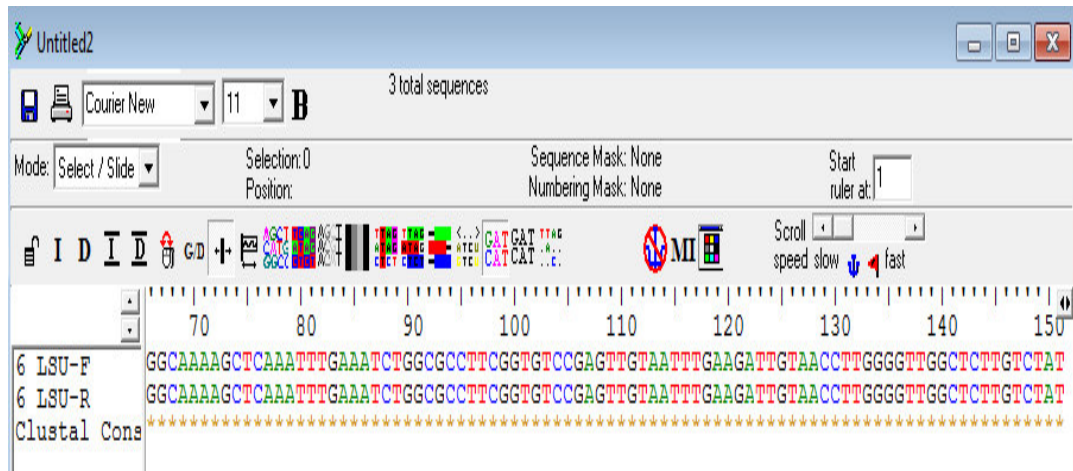
3.1 REVERSE



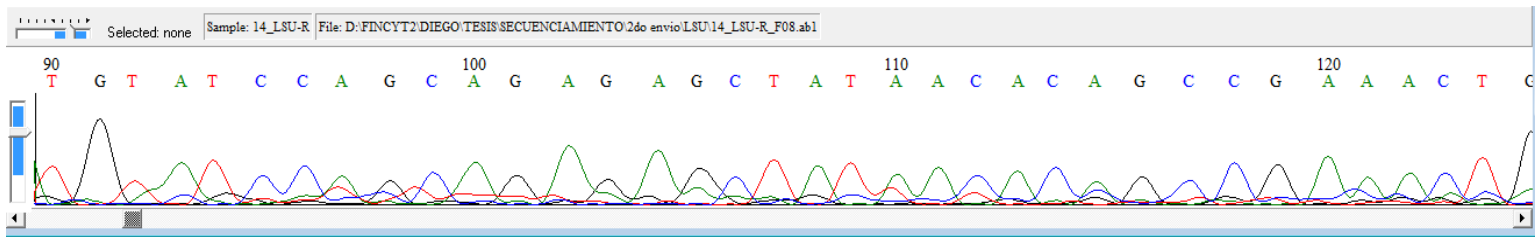
3.2 FORWARD



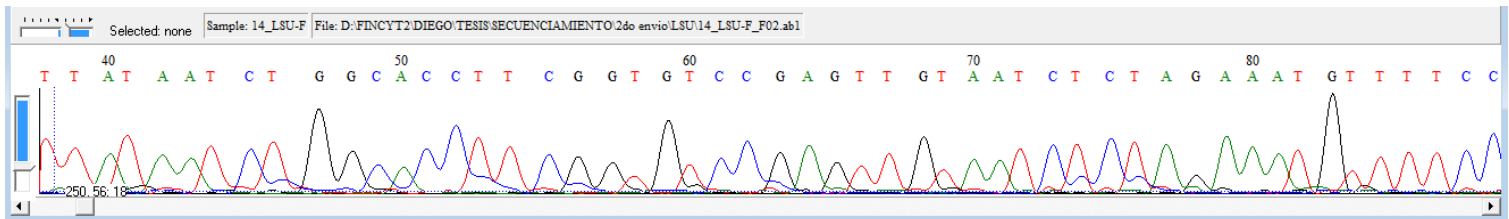
4. CEPA 11.10.X: *Rhodothorula toluoides*



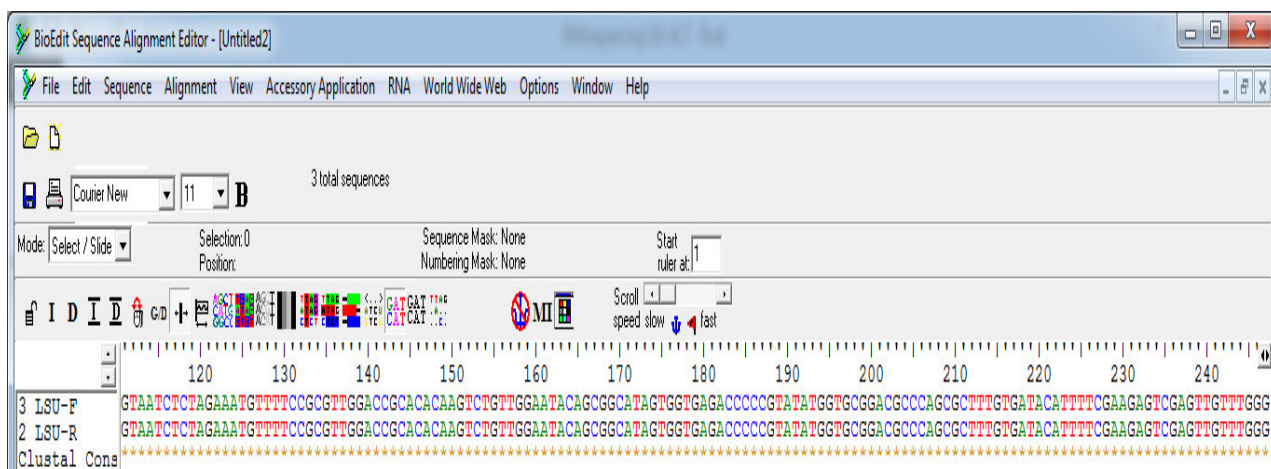
4.1 REVERSE



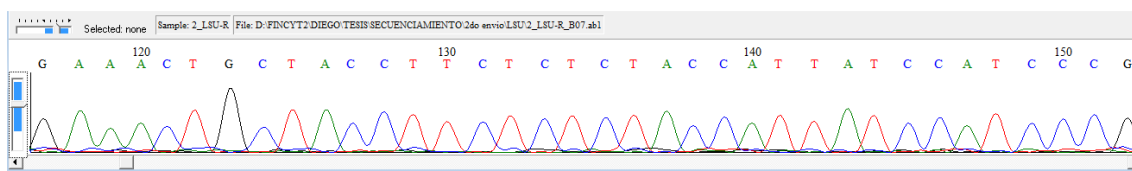
4.2 FORWARD



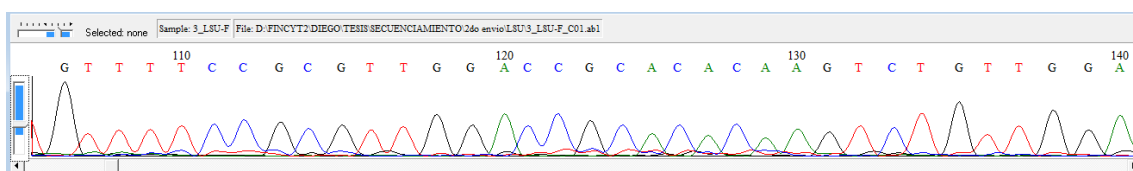
5. 17.1.2: *Rhodothorula mucilaginosa*



5.1 REVERSE



5.2 FORWARD



ANEXO B

I. Análisis estadístico – Software StataMP. Versión 14.0

Durante el procesamiento de las muestras para el análisis de metales pesados se realizaron las mediciones de las estructuras de las plantas, tanto tallo (nervadura central) como a las raíces de cada uno de las plantas de tomate. Posteriormente, se observó en aquellas plantas que fueron tratadas con las levaduras IM y 25.1 que hubo un incremento en el tamaño de las raíces y tallos, esto motivó a realizar algunos análisis estadísticos para determinar si este crecimiento era por acción de las levaduras propiamente dichas o si era por efectos de la solución nutritiva en la que fueron cultivadas. Para lo cual se utilizó la prueba t-student para la comparación de las medias (5 repeticiones en cada tratamiento), debido a que las muestras son pequeñas con un intervalo de confianza del 99.9%, en donde el $p < 0.01$.

Para efectos de un mejor entendimiento de los datos se realizaron las siguientes notaciones en las variables en el Software StataMP tal como se indica a continuación:

- **Control_1:** corresponde a las plantas de tomate cultivadas únicamente en solución hidropónica.
- **Control_2:** corresponde a las plantas de tomate cultivadas en solución hidropónica con la adición del metal Cd^{+2} a una concentración de 10 ppm
- **Lev_1:** Corresponde a aquellas plantas que fueron sometidas al tratamiento con la cepa de levadura IM
- **Lev_2:** Aquellas plantas que fueron sometidas al tratamiento con la cepa de levadura 25.1
- **Lev_1_Cd:** Aquellas plantas que fueron sometidas al tratamiento con la cepa de levadura IM y además dichas plantas estaban sometidas a 10ppm de Cd
- **Lev_2_Cd:** Aquellas plantas que fueron sometidas al tratamiento con la cepa de levadura 25.1 y además dichas plantas estaban sometidas a 10 ppm de Cd.

1. Comparación de media de los tallos control 01 vs tallos de las plantas tratadas con las levaduras IM (lev1) y 25.1 (lev2)

- Planteamiento de hipótesis:

- $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$

- Verificación de la hipótesis

- $H_a: 0.00 < p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
- $H_a: 0.00 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a

- Toma de decisión y conclusión

Según los resultados obtenidos se concluye que existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de los tallos de las plantas tratadas con la levadura IM con respecto al control_1, por tanto se rechaza la H_0 ; es decir, que la media de las plantas tratadas con la levadura IM es mayor a la media de las plantas del control 1 a un intervalo de confianza del 99.9%. Por tanto podemos afirmar que las levaduras ayudaron en el crecimiento de las plantas. Ver tablas 9 y 10 (ver líneas rojas)

Tabla 9. Comparación de medias de los tallos de las plantas del control_1 vs media de los tallos de las plantas tratadas con la levadura IM

```
. ttest control01_tallo_cm == lev1_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
control01_cm	5	87.2	.3741657	.83666	83.97832	90.42168
lev1_t~m	5	114.2	.3741657	.83666	110.9783	117.4217
combined	10	100.7	4.506908	14.2521	79.15287	122.2471
diff		-27	.5291503		-29.66761	-24.33239

```
diff = mean(control01_tall~m) - mean(lev1_tallo_cm)          t = -51.0252
Ho: diff = 0                      degrees of freedom =      8
```

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.0000

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0000

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 1.0000

Tabla 10: Comparación de medias de los tallos de las plantas del control_1 vs media de los tallos de las plantas tratadas con la levadura 25.1

```
. ttest control01_tallo_cm == lev2_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
control01_tallo_cm	5	87.2	.3741657	.83666	83.97832	90.42168
lev2_tallo_cm	5	104.2	.5830952	1.30384	99.17937	109.2206
combined	10	95.7	2.852095	9.019116	82.06438	109.3356
diff		-17	.6928203		-20.49272	-13.50728

diff = mean(control01_tallo_cm) - mean(lev2_tallo_cm) t = -24.5374
Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0 Pr(T < t) = 0.0000	Ha: diff != 0 Pr(T > t) = 0.0000	Ha: diff > 0 Pr(T > t) = 1.0000
------------------------------------	---	------------------------------------

2. Comparación medias de las raíces de las plantas del control 01 vs las medias de las raíces de las plantas tratadas con las levaduras IM (lev1) y 25.1 (lev2)

- Planteamiento de hipótesis:
 - $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$
- Verificación de la hipótesis
 - $H_a: 0.00 < p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.00 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Toma de decisión y conclusión:

Según los resultados existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de las raíces de las plantas tratadas con la levadura IM y 25.1 con respecto al valor de las raíces de las plantas del control_1, por tanto se rechaza la H_0 ; es decir, que la media de las plantas tratadas con las levaduras IM y 25.1 es mayor a la media de las raíces de las plantas del control 1 con un intervalo de confianza del 99.9%. Por tanto se puede afirmar que las levaduras ayudaron en el crecimiento de las raíces de las plantas. Ver tablas 10 y 11.

Tabla 10. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs raíces de las plantas tratadas con la levadura IM

```
. ttest control01_raiz_cm == lev1_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
con~z_cm	5	54.4	.509902	1.140175	50.00959	58.79041
lev1_r~m	5	62.6	.509902	1.140175	58.20959	66.99041
combined	10	58.5	1.408309	4.453463	51.767	65.233
diff		-8.2	.7211103		-11.83534	-4.564663

diff = mean(control01_raiz~m) - mean(lev1_raiz_cm) t = -11.3714
Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.0000

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0000

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 1.0000

Tabla 11. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs raíces de las plantas tratadas con la levadura 25.1

```
. ttest control01_raiz_cm == lev2_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
con~z_cm	5	54.4	.509902	1.140175	50.00959	58.79041
lev2_r~m	5	56	.5477226	1.224745	51.28394	60.71606
combined	10	55.2	.4422166	1.398412	53.0858	57.3142
diff		-1.6	.7483315		-5.372568	2.172568

diff = mean(control01_raiz~m) - mean(lev2_raiz_cm) t = -2.1381
Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.0325

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0650

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 0.9675

- Verificación de la hipótesis

- Ha: $0.0325 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis Ho
- Ha: $0.0650 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis Ha

Se puede observar que el valor p de la media de las raíces de las plantas tratadas con la levadura 25.1 (lev1) es mayor que la media de las raíces del control 1, por tanto se rechaza la hipótesis nula y se confirma que las plantas que fueron tratadas con la levadura 25.1 tuvieron un mayor crecimiento.

3. Comparación de medias de tallos y raíces del control 01 vs tallos y raíces del Control 02

- Planteamiento de hipótesis:
 - $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$
- Verificación de la hipótesis:
 - $H_a: 1.0 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 1.0 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Toma de decisión:

Según los resultados existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de los tallos y raíces ($H_a > p$; $H_a \neq p$) de las plantas del control_1 (plantas únicamente en sol. Hidropónica) con respecto a la media de los tallos y raíces de las plantas del control_2, por tanto se rechaza la H_0 con un intervalo de confianza del 99.9%.; es decir, que aquellas plantas que fueron cultivadas únicamente en solución hidropónica (control_1) tuvieron un mayor crecimiento tanto en raíces y tallos con respecto a las plantas que fueron sometidas a 10ppm de Cd^{+2} (control_2). Ver tablas 12 y 13.

Tabla 12: Comparación de medias de los tallos del control_1 vs tallos de las plantas del control_2

```
. ttest con01_tallo_cm == con02_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
con01_t~	5	87.2	.3741657	.83666	83.97832	90.42168
con02_t~	5	73	.7071068	1.581139	66.9116	79.0884
combined	10	80.1	2.396525	7.578478	68.64242	91.55758
diff		14.2	.8		10.16696	18.23304

diff = mean(con01_tallo_cm) - mean(con02_tallo_cm) t = 17.7500
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0
 Pr(T < t) = 1.0000

Ha: diff != 0
 Pr(|T| > |t|) = 0.0000

Ha: diff > 0
 Pr(T > t) = 0.0000

Tabla 13. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs raíces de las plantas del control_2

```
. ttest con01_raiz_cm == con02_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
con01_r~	5	54.4	.509902	1.140175	50.00959	58.79041
con02_r~	5	45.8	.5830952	1.30384	40.77937	50.82063
combined	10	50.1	1.479114	4.677369	43.02849	57.17151
diff		8.6	.7745967		4.695022	12.50498

diff = mean(con01_raiz_cm) - mean(con02_raiz_cm) t = 11.1026
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0 Pr(T < t) = 1.0000	Ha: diff != 0 Pr(T > t) = 0.0000	Ha: diff > 0 Pr(T > t) = 0.0000
------------------------------------	---	------------------------------------

4. Comparación de las medias de los tallos del control 1 vs tallos de las levaduras IM (lev_1) y 25.1 (lev_2) con metal Cd en la solución hidropónica.

- Planteamiento de hipótesis:
 - $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$
- Verificación de la hipótesis
 - $H_a: 1.00 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 1.00 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Toma de decisión y conclusión

Según los resultados existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de los tallos de las plantas tratadas con la levadura IM con respecto al control_1, por tanto se rechaza la H_0 ; es decir, que la media de las plantas que estuvieron en contacto con una concentración de 10 ppm de Cd y que fueron tratadas con la levadura IM es mayor a la media de las plantas del control 1 a un intervalo de confianza del 99.9%. Por tanto podemos afirmar que las levaduras ayudaron en el crecimiento en el tallo de las plantas aun en presencia del metal Cd. Ver tablas 13 y 14 (ver líneas rojas)

Tabla 13. Comparación de medias de los tallos del control_1 vs tallos de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd

```
. ttest con01_tallo_cm == lev01_Cd_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]
con01_t~	5	87.2	.3741657	.83666	83.97832 90.42168
lev01_..	5	108.4	.9273618	2.073644	100.4151 116.3849
combined	10	97.8	3.564641	11.27239	80.75776 114.8422
diff		-21.2	1		-26.24131 -16.15869

diff = mean(con01_tallo_cm) - mean(lev01_Cd_tallo~m) t = -21.2000
Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
Pr(T < t) = 0.0000 Pr(|T| > |t|) = 0.0000 Pr(T > t) = 1.0000

Tabla 14. Comparación de medias de los tallos del control_1 vs tallos de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd

```
. ttest con01_tallo_cm == lev02_Cd_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]
con01_t~	5	87.2	.3741657	.83666	83.97832 90.42168
lev02_..	5	100.6	.4	.8944272	97.15588 104.0441
combined	10	93.9	2.248209	7.109462	83.15151 104.6485
diff		-13.4	.5477226		-16.16124 -10.63876

diff = mean(con01_tallo_cm) - mean(lev02_Cd_tallo~m) t = -24.4649
Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
Pr(T < t) = 0.0000 Pr(|T| > |t|) = 0.0000 Pr(T > t) = 1.0000

5. Comparación de las medias de las raíces del control 1 vs media de las raíces de las levaduras IM (lev_1) y 25.1 (lev_2) con metal Cd en la solución hidropónica.

- Planteamiento de hipótesis:
 - $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$
- Verificación de la hipótesis: Para lev IM
 - $H_a: 1.00 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 1.00 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Verificación de la hipótesis: Para lev 25.1
 - $H_a: 0.98 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.02 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Toma de decisión y conclusión

Según los resultados existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de las raíces de las plantas tratadas con la levadura IM con respecto al control_1, por tanto se rechaza la H_0 ; es decir, que la media de las raíces de las plantas que estuvieron en contacto con una concentración de 10 ppm de Cd y que fueron tratadas con la levadura IM es mayor a la media de las plantas del control 1 a un intervalo de confianza del 99.9%. Por tanto podemos afirmar que las levaduras ayudaron en el crecimiento de las raíces de las plantas aun en presencia del metal Cd. Ver tablas 15 y 16 (ver líneas rojas).

Tabla 15. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs media de las raíces de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd

```
. ttest con01_raiz_cm == lev01_Cd_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
con01_r~	5	54.4	.509902	1.140175	50.00959	58.79041
lev01_..	5	60.8	.3741657	.83666	57.57832	64.02168
combined	10	57.6	1.10755	3.50238	52.3049	62.8951
diff		-6.4	.6324555		-9.588402	-3.211598

```
diff = mean(con01_raiz_cm) - mean(lev01_Cd_raiz_cm)      t = -10.1193
Ho: diff = 0                                           degrees of freedom = 8
```

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.0000

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0000

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 1.0000

Tabla 16. Comparación de medias de las raíces del control_1 vs media de las raíces de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd

```
. ttest con01_raiz_cm == lev02_Cd_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
con01_r~	5	54.4	.509902	1.140175	50.00959	58.79041
lev02_..	5	52.4	.509902	1.140175	48.00959	56.79041
combined	10	53.4	.4760952	1.505545	51.12383	55.67617
diff		2	.7211103		-1.635337	5.635337

```
diff = mean(con01_raiz_cm) - mean(lev02_Cd_raiz_cm)      t = 2.7735
Ho: diff = 0                                           degrees of freedom = 8
```

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.9879

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0242

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 0.0121

6. Comparación de las medias de los tallos del control 2 vs media de los tallos de las levaduras IM (lev_1) y 25.1 (lev_2) con metal Cd en la solución hidropónica.

- Planteamiento de hipótesis:
 - $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$
- Verificación de la hipótesis: Para lev IM
 - $H_a: 0.00 < p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.00 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Verificación de la hipótesis: Para lev 25.1
 - $H_a: 0.00 < p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.00 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Toma de decisión y conclusión

Según los resultados existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de los tallos de las plantas tratadas con las levaduras IM y 25.1 con respecto a la media de los tallos del control_2, por tanto se rechaza la H_0 ; es decir, que la media de las plantas que estuvieron en contacto con una concentración de 10 ppm de Cd y que fueron tratadas con las levaduras IM y 25.1 es mayor a la media de las plantas del control 2 a un intervalo de confianza del 99.9%. Por tanto podemos afirmar que las levaduras ayudaron en el crecimiento en el tallo de las plantas aun en presencia del metal Cd; además, las plantas del control 2 tuvieron un menor crecimiento debido a que el Cd limitó su crecimiento. Ver tablas 17 y 18 (ver líneas rojas)

Tabla 17. Comparación de medias de los tallos del control_2 vs tallos de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd

```
. ttest con02_tallo_cm == lev01_Cd_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
con02_t~ lev01_..	5	73	.7071068	1.581139	66.9116	79.0884
	5	108.4	.9273618	2.073644	100.4151	116.3849
combined	10	90.7	5.925557	18.73826	62.37043	119.0296
diff		-35.4	1.16619		-41.27912	-29.52088

```
diff = mean(con02_tallo_cm) - mean(lev01_Cd_tallo~m)      t = -30.3552
Ho: diff = 0                                           degrees of freedom =      8
```

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.0000

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0000

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 1.0000

Tabla 18. Comparación de medias de los tallos del control_2 vs tallos de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd

```
. ttest con02_tallo_cm == lev02_Cd_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
con02_t~ lev02_..	5	73	.7071068	1.581139	66.9116	79.0884
	5	100.6	.4	.8944272	97.15588	104.0441
combined	10	86.8	4.615914	14.5968	64.73172	108.8683
diff		-27.6	.8124038		-31.69558	-23.50442

```
diff = mean(con02_tallo_cm) - mean(lev02_Cd_tallo~m)      t = -33.9733
Ho: diff = 0                                           degrees of freedom =      8
```

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.0000

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0000

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 1.0000

7. Comparación de las medias de las raíces del control 2 vs media de las raíces de las levaduras IM (lev_1) y 25.1 (lev_2) con metal Cd en la solución hidropónica.

- Planteamiento de hipótesis:
 - $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$
- Verificación de la hipótesis: Para lev IM
 - $H_a: 0.00 < p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.00 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Verificación de la hipótesis: Para lev 25.1
 - $H_a: 0.00 < p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.00 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Toma de decisión y conclusión

Según los resultados existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de las raíces de las plantas tratadas con las levaduras IM y 25.1 con respecto a la media de las raíces del control_2, por tanto se rechaza la H_0 ; es decir, que la media de las raíces de las plantas que estuvieron en contacto con una concentración de 10 ppm de Cd y que fueron tratadas con las levaduras IM y 25.1 es mayor a la media de las raíces de las plantas del control 2 a un intervalo de confianza del 99.9%. Por tanto podemos afirmar que las levaduras ayudaron en el crecimiento de las raíces de las plantas aun en presencia del metal Cd; además, las raíces de las plantas del control 2 tuvieron un menor crecimiento debido a que el Cd limitó su crecimiento. Ver tablas 19 y 20 (ver líneas rojas)

Tabla 19. Comparación de medias de las raíces del control_2 vs raíces de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd

```
. ttest con02_raiz_cm == lev01_Cd_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]
con02_r~	5	45.8	.5830952	1.30384	40.77937 50.82063
lev01_..	5	60.8	.3741657	.83666	57.57832 64.02168
combined	10	53.3	2.521243	7.972871	41.24616 65.35384
diff		-15	.6928203		-18.49272 -11.50728

diff = mean(con02_raiz_cm) - mean(lev01_Cd_raiz_cm) t = -21.6506
Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
Pr(T < t) = 0.0000 Pr(|T| > |t|) = 0.0000 Pr(T > t) = 1.0000

Tabla 20. Comparación de medias de las raíces del control_2 vs raíces de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd

```
. ttest con02_raiz_cm == lev02_Cd_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]
con02_r~	5	45.8	.5830952	1.30384	40.77937 50.82063
lev02_..	5	52.4	.509902	1.140175	48.00959 56.79041
combined	10	49.1	1.159023	3.665151	43.55881 54.64119
diff		-6.6	.7745967		-10.50498 -2.695022

diff = mean(con02_raiz_cm) - mean(lev02_Cd_raiz_cm) t = -8.5206
Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
Pr(T < t) = 0.0000 Pr(|T| > |t|) = 0.0000 Pr(T > t) = 1.0000

8. Comparación de las medias de los tallos de las plantas en las que fueron inoculadas levaduras vs media de los tallos de las plantas que fueron sometidas a 10ppm de Cd y que fueron tratadas con levaduras IM y 25.1

- Planteamiento de hipótesis:
 - $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$
- Verificación de la hipótesis: Para lev IM
 - $H_a: 0.99 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.0004 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Verificación de la hipótesis: Para lev 25.1
 - $H_a: 0.98 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.02 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Toma de decisión y conclusión

Según los resultados existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de los tallos de las plantas tratadas con las levaduras IM y 25.1 con respecto a la media de los tallos de aquellas plantas que estuvieron en contacto con 10ppm de Cd y que fueron tratadas con las levaduras mencionadas, por tanto se rechaza la H_0 a un intervalo de confianza del 99.9%. Por tanto podemos afirmar que las levaduras ayudaron en el crecimiento en el tallo de las plantas tanto en presencia o en ausencia del metal Cd en la solución hidropónica; A su vez, las plantas que estuvieron en contacto con el metal tuvieron un ligero menor. Ver tablas 21 y 22 (ver líneas rojas)

Tabla 21. Comparación de medias de los tallos de las plantas con levadura IM (lev1) vs tallos de las plantas con Levadura IM (lev1) + 10 ppm Cd

```
. ttest lev1_tallo_cm == lev01_Cd_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
lev1_t~m	5	114.2	.3741657	.83666	110.9783	117.4217
lev01_..	5	108.4	.9273618	2.073644	100.4151	116.3849
combined	10	111.3	1.075484	3.40098	106.1582	116.4418
diff		5.8	1		.7586946	10.84131

```
diff = mean(lev1_tallo_cm) - mean(lev01_Cd_tallo~m)      t = 5.8000
Ho: diff = 0                                           degrees of freedom = 8
```

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.9998

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0004

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 0.0002

Tabla 22. Comparación de medias de los tallos de las plantas con levadura 25.1 (lev2) vs tallos de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd

```
. ttest lev1_raiz_cm == lev01_Cd_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]	
lev1_r~m	5	62.6	.509902	1.140175	58.20959	66.99041
lev01_..	5	60.8	.3741657	.83666	57.57832	64.02168
combined	10	61.7	.4229526	1.337494	59.6779	63.7221
diff		1.8	.6324555		-1.388402	4.988402

```
diff = mean(lev1_raiz_cm) - mean(lev01_Cd_raiz_cm)      t = 2.8460
Ho: diff = 0                                           degrees of freedom = 8
```

Ha: diff < 0
Pr(T < t) = 0.9892

Ha: diff != 0
Pr(|T| > |t|) = 0.0216

Ha: diff > 0
Pr(T > t) = 0.0108

9. Comparación de las medias de los tallos de las plantas en las que fueron inoculadas levaduras solas vs media de los tallos de las plantas que fueron sometidas a 10ppm de Cd y que fueron tratadas con levaduras IM y 25.1

- Planteamiento de hipótesis:
 - $H_0: u_1 - u_2 = 0$; $H_a: u_1 \neq u_2$; $p < 0.01$
- Verificación de la hipótesis: Para lev IM
 - $H_a: 0.99 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.0009 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Verificación de la hipótesis: Para lev 25.1
 - $H_a: 0.99 > p \rightarrow$ se rechaza la hipótesis H_0
 - $H_a: 0.0013 \neq p \rightarrow$ se acepta la hipótesis H_a
- Toma de decisión y conclusión

Según los resultados existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de las medias de las raíces de las plantas que fueron inoculadas las levaduras IM y 25.1 con respecto a la media de las raíces de aquellas plantas que estuvieron en contacto con 10ppm de Cd y que fueron tratadas con las levaduras mencionadas; por tanto, se rechaza la H_0 con un intervalo de confianza del 99.9%. Por tanto podemos afirmar que las levaduras ayudaron en el crecimiento de las raíces de las plantas tanto en presencia o en ausencia del metal Cd en la solución hidropónica; A su vez, las raíces de las plantas que estuvieron en contacto con el metal tuvieron un ligero menor. Ver tablas 23 y 24 (ver líneas rojas)

Tabla 23. Comparación de medias de las raíces del control_2 vs raíces de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd

```
. ttest lev2_tallo_cm == lev02_Cd_tallo_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]
lev2_t~m	5	104.2	.5830952	1.30384	99.17937 109.2206
lev02_..	5	100.6	.4	.8944272	97.15588 104.0441
combined	10	102.4	.6863753	2.170509	99.1185 105.6815
diff		3.6	.7071068		.0352587 7.164741

```
diff = mean(lev2_tallo_cm) - mean(lev02_Cd_tallo~m)      t = 5.0912
Ho: diff = 0                                           degrees of freedom = 8
```

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
Pr(T < t) = 0.9995 Pr(|T| > |t|) = 0.0009 Pr(T > t) = 0.0005

Tabla 24. Comparación de medias de las raíces del control_2 vs raíces de las plantas con Levadura 25.1 (lev2) + 10 ppm Cd

```
. ttest lev2_raiz_cm == lev02_Cd_raiz_cm, unpaired level(99.9)
```

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[99.9% Conf. Interval]
lev2_r~m	5	56	.5477226	1.224745	51.28394 60.71606
lev02_..	5	52.4	.509902	1.140175	48.00959 56.79041
combined	10	54.2	.6960204	2.20101	50.87239 57.52761
diff		3.6	.7483315		-.1725675 7.372568

```
diff = mean(lev2_raiz_cm) - mean(lev02_Cd_raiz_cm)      t = 4.8107
Ho: diff = 0                                           degrees of freedom = 8
```

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
Pr(T < t) = 0.9993 Pr(|T| > |t|) = 0.0013 Pr(T > t) = 0.0007

ANEXO C

MEDIOS DE CULTIVO

1. MEDIO BÁSICO PARA CULTIVO (Breierova E., 2002) (G/L)

Extracto de Levadura.....	4
Glucosa.....	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O.....	0.2
NaCl.....	0.1
CaCl ₂	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5
H ₃ BO ₄	1.25
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0.1
KI.....	0.25
MnSO ₄ .5H ₂ O.....	1.0
FeCl ₃ .6H ₂ O.....	0.5
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O.....	0.5

pH 6.0

Filtrar 0.25u

Agar YPG

Glucosa.....	30
Peptona.....	10
Extracto de Levadura.....	5
Agar.....	18
pH 6.0	

Caldo YPG

Glucosa.....	30
Peptona.....	10
Extracto de Levadura.....	5
pH 6.0	

Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x

NaCl.....	8.06
KCl.....	0.22
Na ₂ HPO ₄	1.15
KH ₂ PO ₄	0.20
H ₂ O	
pH 6.0	

2. COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA “SAN MARCOS”

Concentración de los nutrientes aportados por la Solución hidropónica San Marcos al diluirla según las indicaciones de la etiqueta (5ml de Solución A y 5ml de Solución B), no se considera lo aportado por el agua potable que se usa al diluirla.	
Elemento	Concentración (ppm)
N	200
K	250
P	40
Mg	35
S	46
Ca	116
Fe	1.5
Mn	0.5
Zn	0.2
Cu	0.1
B	0.4
Mo	0.01

ANEXO D

1. Efectos del Cd^{+2} sobre las plantas de tomate



(A)



(B)



(C)



(D)

- En la imagen (A) se observa los efectos toxicos del Cd^{+2} en las plantas de tomate, se observa que hay marchites, sequedad en las hojas, de igual manera en la imagen (C) y (D) se observa clorosis, amarillamiento y necrosis en las hojas y tallos. En la imagen B se obser el efecto del Cd^{+2} en las raices de las plantas de tomate expuestas a 10 ppm de Cd^{+2} que limitan su crecimiento.

2. Efecto de las levaduras sobre las plantas de tomate



(E)



(F)



(G)



(H)

- En la imagen (E) se observa los efectos de las levaduras sobre las plantas de tomate, se observa que las plantas tienen un crecimiento normal y sano con hojas y tallos con buen crecimiento (F), de igual manera en la imagen (G) se observa que el crecimiento normal de las raíces ya que no se encuentran en contacto con el metal Cd^{+2} y en la imagen (H) se observa el normal crecimiento de las raíces de las plantas pese a que estas están en contacto con Cd^{+2} a 10 ppm.